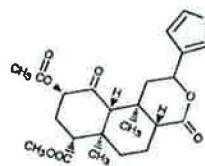


**Rapport de stage - Master 2**  
**Biodiversité des Ecosystèmes Tropicaux (BEST) – Spécialité Biodiversité des**  
**Ecosystèmes Cultivés (BEC).**



**Etude de la réponse des femelles de *Bactrocera cucurbitae* aux**  
**effluves de Cucurbitaceae : contribution méthodologique et**  
**mesure de l'attractivité.**



**Par Késia BOULY**  
**Soutenance le 27 juin 2012**

Sous la direction de :  
Co-encadrée par :

**Serge QUILICI**, entomologiste  
**Jean-Philippe DEGUINE**, entomologiste agroécologue  
**Toulassi ATIAMA-NURBEL**, doctorante Biologie Animale Entomologie

# REMERCIEMENTS

Ce stage de fin d'étude a été d'une grande richesse autant sur le plan humain que professionnel. Aussi, j'aimerais humblement remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce stage dans les meilleures conditions au sein du laboratoire d'Ecologie Terrestre et de lutte intégrée (CIRAD, Pôle de Protection des Plantes du service de protection des plantes).

Je remercie tout d'abord mon maître de stage, Serge Quilici, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci pour votre implication, pour vos précieux conseils et pour votre enthousiasme à toute épreuve.

J'exprime ma profonde affection et reconnaissance à mes co-encadrants, Jean-Philippe Deguine et Toulassi Atiama Nurbel. Jean-Philippe, j'ai découvert grâce à toi l'agro-écologie et ses enjeux, discuter avec toi et évoluer dans cette équipe m'encourage à croire en une agriculture raisonnée et plus juste. Merci pour ton esprit critique et pragmatique, pour ton soutien et tes encouragements. Merci de m'avoir pris sous ton aile, de m'avoir donné les bons conseils et de m'avoir fait rencontrer les bonnes personnes. Nicolas et moi te remercions également pour les noix de coco fraîchement cueillies de ton jardin, avec lesquelles nous avons cuisiné de merveilleux curry de crevettes !

Toulassi, je te serai éternellement reconnaissante pour l'esprit d'équipe et la complicité que tu as su instaurer entre nous, pour ton implication dans mon stage, pour toutes les corrections que tu as faite et l'immense aide que tu m'as apporté. Merci encore pour l'ingrédient secret du cabri Massalé à la Malbar et les nombreuses recettes péi ! Tu es une « thésarde » hors pair, une excellente maître de stage et une amie de choix !

Je souhaite également inclure dans mes remerciements toute l'équipe Entomo : Morgen, Moutou, Serge, Antoine, Jim, Cédric et Lulu. Travailler avec vous a été un réel plaisir, vous êtes une équipe de choc ! Un merci tout spécial à Moutou et Serge sans qui tout ça n'aurait pas été possible.

Ce serait un affront si je n'adressai pas mes remerciements à Fred pour son aide précieuse sur R ! Même si c'était la gal' R pour avoir un rendez vous avec toi, tu as toujours su trouver un moment pour m'aider. Merci pour tout, tes petits sourires moqueurs vont me manquer !

Je remercie tous les stagiaires et VSC que j'ai rencontré notamment Morguen, expert en agro-écologie, bonne humeur et entraide ont toujours été de mise. Un énorme BIG UP à mes « collocs », Maéva, Domi, Sarah, Sylvia, Laure-Hélène, Maxime, Léo, Pioum, Tantine, Sara 2 et Hélène. On a tous partagé des moments extra, fous rires et moucatages, stress et coup de blues. Je vous souhaite à tous de choisir le chemin qui vous rendra heureux et épanouis. Notre maison chez les Ch'ti vous sera toujours ouverte et la bière toujours fraîche !

Je termine par le meilleur, un énorme merci à ma famille d'avoir toujours cru en moi et d'être toujours présente malgré les 10 000 km. Nico, je te serai éternellement reconnaissante pour le soutien que tu m'as apporté tout au long de mon master et pendant ce stage. Merci d'avoir supporté mon stress et d'avoir si bien pris soin de moi, merci pour les bons plats et les massages quand je rentrais tard le soir ! Je t'aime !

# SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION	2
I-PROBLEMATIQUE GENERALE	2
II-MODELE D’ETUDE : <i>BACTROCERA CUCURBITAE</i>	3
III-INTERACTIONS PLANTE-INSECTE : LA SELECTION DE L’HOTE	3
IV-METHODES D’ETUDE DES REPONSES COMPORTEMENTALES	5
V- CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L’ETUDE	6
MATERIEL ET METHODES	6
I-MATERIEL BIOLOGIQUE	6
II-CHOIX DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL	7
III-ETUDE DE L’INFLUENCE DE CERTAINS PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DES FEMELLES SUR LEUR REPONSE COMPORTEMENTALE	11
IV-MESURE DE L’ATTRACTIVITE RELATIVE DE DIFFERENTS FRUITS.	12
V-METHODES D’ANALYSE	12
RESULTATS	14
I - CHOIX DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL	14
II - ETUDE DE L’INFLUENCE DE CERTAINS PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DES FEMELLES SUR LEUR REPONSE COMPORTEMENTALE	17
III - MESURE DE L’ATTRACTIVITE RELATIVE DE DIFFERENTS FRUITS.	18
DISCUSSION	19
I – APPORTS METHODOLOGIQUES ET DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX	19
II- ETUDE DE L’INFLUENCE DE CERTAINS PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DES FEMELLES SUR LEUR REPONSE COMPORTEMENTALE	21
III- ATTRACTIVITE RELATIVE DE DIFFERENTS FRUITS ET/OU STADES PHENOLOGIQUES	23
IV PERSPECTIVES DE RECHERCHE	24
CONCLUSION	25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	26
GLOSSAIRE	33
ANNEXES	34

# INTRODUCTION

## I-Problématique générale

Les « Mouches des légumes » sont des diptères de la famille des Tephritidae qui comprend 4000 espèces dont 700 appartiennent à la sous famille des Dacinae (Annexe 1) (Fletcher 1987). Parmi ces dernières, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) s'attaque à La Réunion à 17 espèces de plantes hôtes (Annexe 2) de la famille des Cucurbitaceae (Vayssières 1999). Cette espèce est considérée comme le problème phytosanitaire majeur des cultures de Cucurbitaceae et constitue le modèle biologique de la présente étude. Elle est en outre inscrite sur la liste de quarantaine de la plupart des pays importateurs. Les dégâts sont causés par les femelles qui pondent dans les jeunes fruits, la blessure due à l'oviposition\* laissant entrer et proliférer divers pathogènes tandis que l'alimentation des larves dans la pulpe entraîne la détérioration des fruits et leur chute précoce (Clarke *et al.* 2011). A La Réunion les pertes peuvent encore concerner 30 à 90% des récoltes selon l'espèce de Cucurbitaceae et la saison (Ryckewaert *et al.* 2010) même si on dispose d'un attractif sexuel (le Cue-lure) qui attire les mâles de *B. cucurbitae*. Un grand nombre de recherches porte sur la localisation des plantes hôtes et l'attraction olfactive des femelles en vue d'optimiser des méthodes de lutte intégrée.

La localisation de la plante hôte par ces insectes phytophages est primordiale au succès de leur descendance puisque ce dernier dépend de leur faculté à choisir un lieu de ponte optimal. Cependant, le processus de localisation n'obéit jamais à un schéma stéréotypé et l'importance de la variabilité des réponses comportementales des insectes est souvent négligée. Ainsi, la compréhension des interactions insecte-plante et des paramètres écologiques ou liés à la physiologie de l'insecte susceptibles de modifier ces interactions est essentielle à la bonne gestion des agro-écosystèmes et à la prise en charge du problème des mouches nuisibles aux Cucurbitaceae. Des travaux sur certaines espèces de Tephritidae, comme par exemple la Mouche de la tomate, *Neoceratitis cyanescens* (Bezzi), (Brévault & Quilici 1999, 2000 a et b, 2007 a et b, 2009 a) et la Mouche de la pomme, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Aluja & Prokopy 1993) ont montré que ces espèces sont plus réceptives aux signaux olfactifs lors de la recherche de la plante hôte à moyenne distance alors que les stimuli visuels interviennent à proximité des fruits hôtes (Aluja & Prokopy 1993, Brévault & Quilici 2010). Concernant notre modèle, une récente étude a en outre permis de découvrir les molécules attractives chez le concombre (*Cucumis sativus* L.) (Siderhurst & Jang 2010). Dans la continuité de ces travaux, nous nous proposons de mettre au point un protocole permettant l'étude de l'attraction olfactive d'une plus large gamme de plantes hôtes de cette espèce de Tephritidae.



**Figure 1 :** Cycle biologique de *Bactrocera cucurbitae*.



Une fois accouplées et gravides, les femelles pondent leurs œufs sous l'exocarpe du fruit grâce à l'ovipositeur(1). Après quelques jours les œufs éclosent et les 3 stades larvaires et les larves se développent en se nourrissant du fruit (2). Au bout d'une semaine, les asticots sautent du fruit et effectuent la nymphose dans le sol (3). La métamorphose est complète au bout d'une dizaine de jours et les nouveaux adultes émergent de la pupa pour former une nouvelle génération (4).

## II-Modèle d'étude : *Bactrocera cucurbitae*

### II-1. Cycle biologique

Chez les Mouches des Cucurbitaceae, comme chez tous les insectes holométaboles\*, les larves sont très différentes des adultes du point de vue de leur niche écologique, de leur anatomie et de leur régime alimentaire. Leurs larves vivent et s'alimentent sur les plantes hôtes alors que les adultes, vivent sur des plantes non hôtes en bordure des champs où ils réalisent la plupart de leurs activités comme l'accouplement, le repos et l'alimentation (Nishida & Bess 1957). La femelle pond des paquets d'œufs blanchâtres à quelques millimètres sous l'exocarpe\* dans les jeunes fruits hôtes. Puis les 3 stades larvaires se développent en se nourrissant de la pulpe du fruit et les asticots sautent du fruit juste avant la pupaison\* pour s'enfouir en terre et effectuer la nymphose\*. Enfin, après émergence, selon la qualité nutritive du fruit hôte et la température, les adultes acquièrent plus ou moins rapidement la maturité sexuelle (Figure 1) (Vayssières *et al.* 2008).

### II-2. Ethologie et écologie

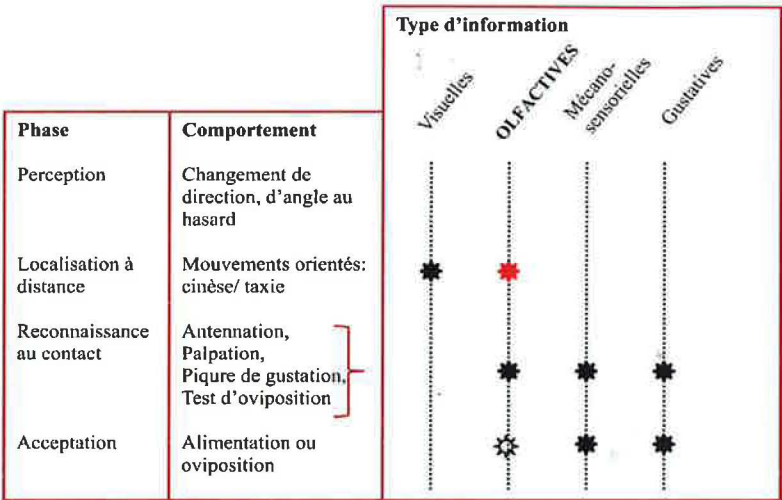
Les Dacini sont des insectes diurnes (Vayssières 1999) et certaines activités sont restreintes à des moments particuliers de la journée. Gouvernés par le rythme circadien\* et la lumière (Fletcher 1987), les comportements d'alimentation et de ponte ont lieu dans la matinée (Syed 1969, Nishida & Bess 1950). A contrario, l'activité sexuelle des Dacini se déroule au crépuscule (Bateman 1972) et sur des plantes non hôtes. Enfin, la luminosité, l'humidité et la température jouent un rôle sur l'abondance des espèces : chez *B. cucurbitae*, des températures comprises entre 18 et 29°C et une humidité de 60 à 70 % permettent un taux de reproduction optimal (Dhillon *et al.* 2005, Vargas *et al.* 2000).

## III-Interactions plante-insecte : la sélection de l'hôte

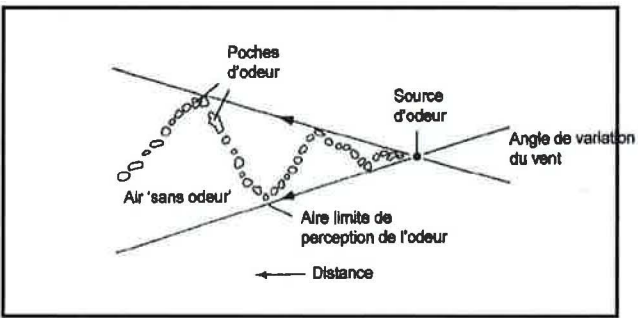
### III-1. Spécialisation d'hôte

La notion de plante hôte est importante à considérer pour aborder les relations insecte-plante. Dans le cas des Dacini, une plante hôte est une plante spécifiquement choisie par la femelle gravide comme site de ponte et qui permet le développement complet des stades pré-imaginaux. La femelle sélectionne donc les plantes sur lesquelles elle dépose ses œufs et sur lesquelles sa progéniture pourra s'alimenter (Robert 1986). Les individus peuvent avoir une gamme d'hôte restreinte, intermédiaire ou large et sont alors respectivement qualifiés de monophage, oligophage ou polyphage. A la Réunion, le régime alimentaire de *B. cucurbitae* est oligophage car sa gamme d'hôte est limitée aux Cucurbitaceae (Ryckewaert *et al.* 2010). La spécialisation d'hôte peut également concerner l'organe de la plante consommé car un insecte phytophage se nourrit rarement de toutes les parties de la plante hôte. Parfois, les préférences trophiques dépendent aussi du stade phénologique de l'organe (Schoonhoven *et al.* 1998). Vayssières (1999) a constaté que les Mouches des Cucurbitaceae ont tendance à pondre préférentiellement dans les jeunes fruits, mais il a recensé de manière épisodique des cas de pontes dans les organes végétatifs et dans les fleurs mâles.

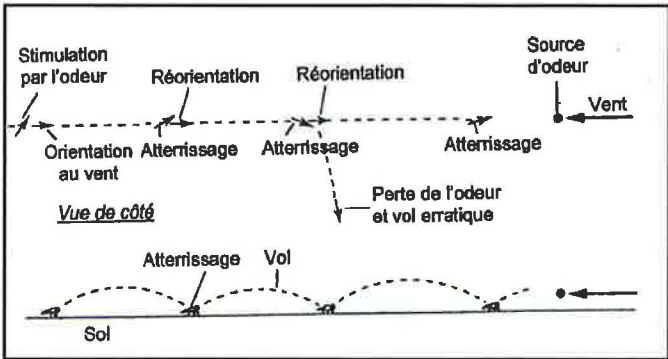
**Figure 2 : Séquence générale de sélection d'une plante hôte par les insectes avec les différents types de stimuli impliqués.** Dans la colonne de gauche figurent les différentes phases comportementales, dans celle du milieu sont décrits les comportements correspondants et dans la colonne de droite les différents types de stimuli émis par plantes sont indiqués. Les étoiles noires représentent les signaux impliqués dans la localisation de l'hôte répertoriés dans la littérature alors que les étoiles blanches indiquent les signaux dont l'implication est suggérée. L'étoile rouge représente les stimuli étudiés durant cette étude.



**Figure 3 : Dispersion de l'odeur depuis la source (D'après Bernays & Chapman 1994, Bévault 1999).** Avec les changement de direction du vent, l'odeur est structuréesousforme de bouffées.



**Figure 4 : Réponse de l'insecte à l'odeur d'une plante (D'après Bernays & Chapman 1994, Bévault 1999)** L'insecte s'oriente contre le vent chargé d'odeur par une anémotaxie positive.





### III-2. Localisation de l'hôte

Lors de la localisation de l'hôte, les insectes répondent aux stimuli par des successions de séquences comportementales appropriées (Figure 2). Au cours du processus de sélection d'une plante hôte, deux étapes principales sont distinguées : la phase de localisation à distance et la phase de reconnaissance au contact qui n'est pas traitée dans ce rapport. La localisation à distance implique d'une part l'attraction olfactive et d'autre part l'attraction visuelle. L'attraction olfactive suppose qu'il y ait une communication interspécifique entre les insectes phytophages et leurs plantes hôtes grâce à des médiateurs chimiques. Ces molécules prennent le nom de kairomones lorsqu'elles constituent un message bénéfique pour le récepteur (l'insecte) au détriment de l'émetteur (la plante). C'est grâce à leurs antennes que les insectes captent ces molécules. En effet, les antennes sont pourvues d'organes sensoriels appelés sensilles (Annexe 3) qui répondent de manière spécifique à un médiateur chimique ou à une famille de médiateurs. Les influx nerveux induits par les molécules odorantes comme les effluves de plantes, déclenchent une réponse comportementale spécifique de l'insecte. Les composés olfactifs peuvent être classés en composés spécifiques ou généraux et leur concentration varie en fonction de l'organe de la plante. Les effluves de plantes « taxon-spécifique » peuvent agir comme un stimulant de la nutrition ou de l'oviposition. Dans une récente étude, l'électro-antennographie couplée à une chromatographie en phase gazeuse (GCEAD), a révélé la réponse antennaire de *B. cucurbitae* à 31 substances volatiles de concombre (Siderhurst & Jang 2010). Cette étude a permis de concevoir des mélanges de neuf composés volatils attractifs provenant de la plante étudiée.

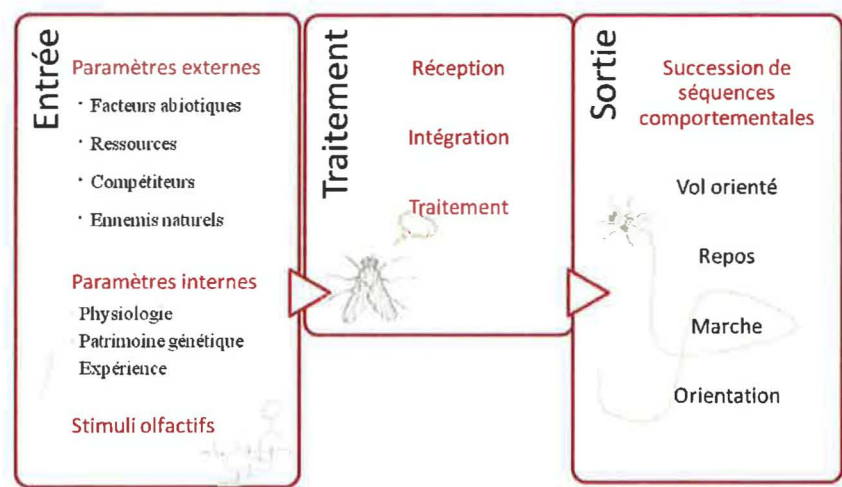
Lorsque les odeurs sont perçues, l'insecte se déplace vers la source d'émission du signal mais il est perturbé par les turbulences du flux d'air. Ainsi, en conditions naturelles, les effluves sont dispersés sous forme de panache d'odeurs (Figure 3) de sorte que l'insecte ne suit pas un gradient d'odeur mais qu'il perçoit plutôt des séries de bouffées d'odeurs entrecoupées de périodes sans odeurs (Carde & Willis 2008, Murlis et al 1992). Les réponses d'orientation peuvent être directes (taxie) ou indirectes (cinèse). La taxie est une réaction de locomotion orientée, déclenchée et entretenue par un agent physique ou chimique externe (Husson 1968). Lorsqu'un comportement orienté de l'insecte est déclenché par des molécules perçues par des chémorécepteurs, comme dans le cas d'un gradient d'odeur sans flux d'air, il s'agit de chémotaxie. Lorsqu'un phénomène de taxie est stimulé par la direction du vent, on parle d'anémotaxie (Schoonhoven et al. 1998). Les comportements anémotactiques influencés par les odeurs de plantes se rencontrent souvent chez les insectes, on parle d'anémotaxie positive conditionnée par l'odeur lorsque celle-ci stimule cette orientation (Figure 4). Une anémotaxie positive conditionnée par l'odeur de tomate a ainsi été montrée chez *N. cyanescens* (Brévault & Quilici 2010).

### II-3. Facteurs influençant la réponse des femelles aux effluves

Les facteurs exogènes, biotiques ou abiotiques, peuvent influencer le choix de l'hôte chez les insectes. Les différences régionales dans les préférences d'hôtes reflètent souvent une adaptation aux conditions locales comme la disponibilité en ressources et les interactions avec d'autres organismes compétiteurs (Robert 1986,



**Figure 5:** Schéma des paramètres susceptibles d’influencer la réponse comportementale des insectes aux stimuli olfactifs (d’après Brévault 1999).



Aluja *et al.* 1993) ou individus conspécifiques (Schoonhoven *et al.* 1998) pouvant entraîner une spécialisation d'hôte. Dans diverses zones de son aire de répartition, *B. cucurbitae* apparaît comme une espèce à tendance polyphage alors que sur l'île de La Réunion, sa gamme d'hôte est au contraire restreinte puisqu'elle attaque 17 espèces de Cucurbitaceae (Bossier *et al.* 1990, Etienne 1972) (Annexe 2). Il a été suggéré qu'à La Réunion, les restrictions de gamme d'hôtes pourraient être dues à des pressions de compétition pour les ressources notamment avec *N. cyanescens* et les espèces de *Ceratitis* (Ryckewaert *et al.* 2010). Dans certains cas chez les Tephritidae, comme chez *R. pomonella*, la présence de phéromones de marquage de l'hôte (HMP) émises par une femelle dissuade les femelles conspécifiques ou non de pondre (Brévault & Quilici 2009 b) alors que dans d'autres cas, comme chez *Ceratitis capitata*, la phéromone d'oviposition stimule la ponte des femelles (Bernays & Chapman 1994). La spécificité d'hôtes peut également être modifiée selon la saisonnalité (Mackenzie & Dixon 1990, Moran 1992) et les facteurs environnementaux associés comme le vent, la température, l'humidité et la photopériode (Figure 5).

Les régimes alimentaires peuvent également être sous l'influence de facteurs endogènes (Figure 5) comme l'évolution des besoins nutritifs au cours du développement de la larve ou comme l'apparition de la maturité sexuelle. Il semblerait que la quantité d'oocytes matures constitue un signal qui modifie le comportement de la femelle en la rendant moins exigeante et moins sélective. Ainsi la forte charge en œufs aurait tendance à faciliter l'acceptation d'une plante (Minkenberg *et al.* 1992). Un phénomène d'apprentissage peut également influencer les futurs choix de substrat pour l'oviposition comme chez *R. pomonella* qui, une fois habituée à pondre dans la pomme, n'accepte plus d'autres plantes hôtes (Prokopy *et al.* 1982). Enfin, une différence de gamme d'hôte peut être due à des différences génétiques entre populations (Sword & Chapman 1994).

#### IV-Méthodes d'étude des réponses comportementales

Pour étudier la réponse comportementale des insectes en présence de substances volatiles, il est possible de réaliser plusieurs types de bio-essais utilisant de l'air en mouvement ou non. Dans les bio-essais utilisant de l'air en mouvements, les composés volatils sont acheminés dans le flux sous forme d'un panache d'odeur et la réponse comportementale de l'insecte étudié consiste à entrer dans et/ou à quitter le panache. Ces analyses comportementales sont souvent réalisées en tunnel de vol pour les insectes volants et/ou en olfactomètre. Les olfactomètres sont largement utilisés pour étudier la réponse phéromonale d'un grand nombre d'insectes (Katsoyannos *et al.* 1980, Sullivan *et al.* 2000). Plusieurs types de dispositifs existent, comme les olfactomètres à un bras, ceux en Y où chacun des deux bras contient une odeur particulière, ceux à quatre et six bras (Turlings *et al.* 2004, D'Alessandro & Turlings 2005) qui permettent d'apprécier l'attractivité relative d'un plus grand nombre de composés. Les olfactomètres sont munis d'une ventilation au niveau de la chambre odorante ce qui permet une observation de l'anémotaxie de l'insecte à courte distance. Le flux d'air doit être contrôlé et ne pas engendrer de fortes turbulences pour ne pas perturber le comportement des insectes. Les arthropodes étant en général attirés par la lumière, il est en outre important de contrôler l'effet



**Figure 6 :** Elevage des mouches en chambre climatique



**Figure 7 :** Ressource alimentaire  
(Sucre et hydrolysate de protéine)



**Figure 8 :** Abreuvoir



de la luminosité (Robacker & Fraser 2001) et de randomiser l'emplacement des essais pour optimiser les résultats. De plus, pour tester l'attraction des stimuli olfactifs émis par une plante hôte sur le comportement d'insectes phytophages, il est important de contrôler et de limiter au maximum les caractéristiques visuelles des stimuli en dissimulant les plantes émettrices d'odeurs. Les études comportementales peuvent également être conduites sans flux d'air contrôlé notamment dans des grandes cages situées en extérieur mais dans ce cas, les facteurs environnementaux sont peu contrôlables. Enfin, une des méthodes les plus précises et de plus en plus utilisée (Alagarmalai *et al.* 2009, Cha *et al.* 2008, Cruz-Lopez *et al.* 2006, Gonzalez *et al.* 2006, Malo *et al.* 2005, Nojima *et al.* 2003, Siderhurst & Jang 2006, 2010, Zhang *et al.* 1999, Zhu *et al.* 2003), est l'électro-antennographie couplée à la chromatographie en phase gazeuse qui permet de détecter, une à une, les molécules ayant une activité biologique (Agelopoulos *et al.* 1999, Bruce *et al.* 2005).

## V- Contexte et objectifs de l'étude

Ce stage vient en appui au premier thème de la thèse de Toulassi Atiama-Nurbel : « Caractérisation de la réponse des femelles de *Bactrocera cucurbitae* et de *Dacus ciliatus* aux effluves émises par leurs plantes hôtes, rencontrées à La Réunion ». Cette thèse, financée par le Cirad, est dirigée par Serge Quilici (Cirad, UMR PVBMT), Anne Bialecki (Université de La Réunion, LCSNCA) et co-encadrée par Jean-Philippe Deguine (Cirad, UMR PVBMT).

L'objectif de ce stage est d'apporter une contribution méthodologique à l'étude des relations insecte-plante, plus précisément à l'étude de la spécialisation d'hôte chez *B. cucurbitae*. On se propose pour cela, (i) de déterminer une méthode permettant de quantifier l'attraction des femelles par des odeurs de plantes hôtes, (ii) de définir certains paramètres physiologiques des femelles déterminant pour la mesure de l'attractivité d'un fruit, (iii) de tester l'attractivité relative vis-à-vis des femelles de différents fruits hôtes sauvages et cultivés présents à La Réunion.

# Matériel et méthodes

## I-Matériel biologique

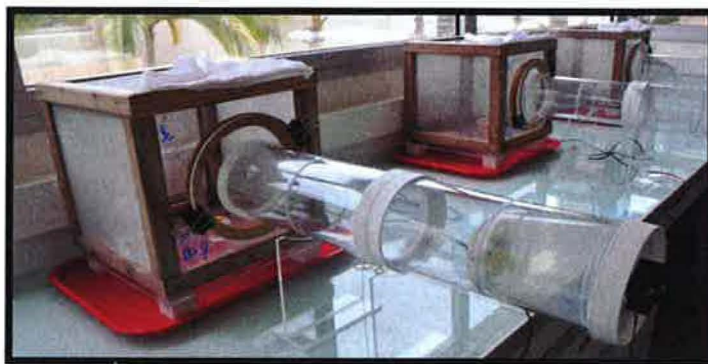
### I-1. Les mouches

L'ensemble des expérimentations est réalisé avec des femelles de *B. cucurbitae* adultes élevées dans des chambres climatiques en conditions contrôlées ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  d'humidité relative et photopériode de 12h) pendant plus de 50 générations au laboratoire d'Ecologie Terrestre et de lutte intégrée (CIRAD, Pôle de Protection des Plantes (Figure 6). La souche de mouches utilisée provient de citrouilles infestées (*Cucurbita maxima* L.) collectées en juin 2000 sur trois localités à La Réunion (Petite Ile, Bassin Martin et Piton Saint Leu). Leur alimentation est constituée de sucre de canne cristallisé et d'hydrolysate enzymatique de levure de bière (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) (Figure 7) et l'apport continu en eau est assuré par





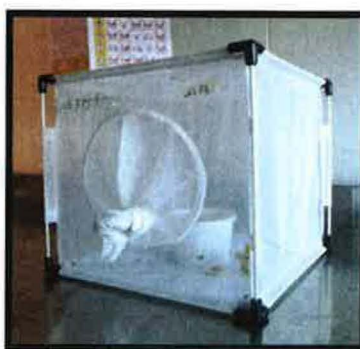
**Figure 9 :** Serre « Insect proof »



**Figure 10 :** Olfactomètres de type A



**Figure 11 :** Olfactomètre de type B



**Figure 12 :** Dispositif de petites cages avec boîte de piégeage

des éponges dont la base est immergée dans un récipient (Figure 8). Cinq fois par semaine, on introduit pendant une heure dans la cage mère d'élevage (femelles pondeuses) une courgette (*Cucurbita pepo* L.) qui constitue le substrat de ponte. La courgette contenant les œufs est ensuite placée dans un récipient tapissé de féculé de pomme de terre qui absorbe l'excédent d'humidité. Les larves sont régulièrement nourries avec de la citrouille et à la fin de leur cycle, sautent pour s'empurger dans le sable placé sous le récipient. Les pupes sont récoltées par tamisage du sable et placées dans des cages cubiques de 40 x 40 x 40 cm jusqu'à émergence, ce qui permet d'obtenir pour les essais des cohortes d'adultes d'âges déterminés. La nouvelle cohorte d'adultes dispose des mêmes conditions de nourriture et d'eau *ad libitum* que les adultes de la cage mère, mais les femelles restent naïves c'est-à-dire qu'elles n'ont eu aucun contact avec des plantes hôtes et donc aucune expérience de ponte sur des fruits hôtes depuis l'émergence. Les femelles à tester sont prélevées par aspiration à partir des cages d'élevage plusieurs heures avant le début des essais et placées dans les dispositifs expérimentaux.

## **I-2. Le matériel végétal**

Les différentes espèces de plantes considérées (Annexe 2) sont cultivées en serre « Insect proof » au CIRAD sur le site de la station de Ligne Paradis (Figure 9) avec un itinéraire technique contrôlé (pas de pesticides). La culture des plantes-hôtes en serre sur le site expérimental offre plusieurs avantages : la cueillette des fruits au stade phénologique souhaité juste avant l'essai et la possibilité d'avoir des fruits indemnes de toute attaque de phytophages. Le matériel végétal à tester est prélevé sur le plant juste avant les manipulations, il est conservé à température ambiante et découpé juste avant le début de l'essai. Le choix de couper le fruit est basé sur le fait que, selon [Brévault & Quilici \(2009 a\)](#) la dénaturation et l'exposition à l'air de la chair des fruits augmentent leur attractivité chez *N. cyanescens*.

## **II-Choix du dispositif expérimental**

Il s'agit ici de tester différents dispositifs afin de mettre en place un protocole permettant de quantifier l'attraction olfactive de *B. cucurbitae* par diverses plantes hôtes. Plusieurs dispositifs expérimentaux sont testés : (i) deux types d'olfactomètres à une voie (Figure 10 et 11) et (ii) des petites cages avec un dispositif de petites cages (Figure 12). Pour l'ensemble des essais, la date de l'expérimentation, les modalités testées, l'âge, le sexe et le nombre de mouches sont renseignées. Dans l'ensemble des essais, les fruits des différentes plantes-hôtes sont présentés sous forme de morceaux et leurs caractéristiques sont notées : l'espèce et/ou la variété de la plante, le poids, la longueur et la largeur du fruit. Sauf précision contraire, chaque essai est répété trois fois, les différents traitements étant présentés en randomisation totale. Un grand nombre de tests préliminaires, ne nécessitant pas d'analyses statistiques, ont permis d'ajuster les conditions expérimentales.



Ainsi, pour le bon déroulement des expérimentations :

- Comme pour d'autres modèles biologiques, une phase d'acclimatation des femelles dans le dispositif est nécessaire (Cha *et al.* 2008), dans notre cas cette phase dure 3 heures après l'aspiration des mouches,
- en olfactomètre, une durée d'observation de 30 minutes s'avère suffisante. Cette observation corrobore les travaux de Dilrukshika & Karunaratne (2009) qui ont étudié par olfactométrie, l'attraction des femelles de *B. cucurbitae* pour les phéromones mâles.
- le nettoyage des dispositifs expérimentaux après un essai doit se faire par immersion totale dans l'eau claire pendant une durée minimum de 3 heures,
- la température doit être d'environ 25°C (cette observation est en concordance avec les travaux de Dilrukshika & Karunaratne (2009).
- la répartition de la lumière sur les dispositifs expérimentaux doit être homogène.

**II-1. Les olfactomètres à une voie**

*II-1.1. Description du dispositif et procédure générale*

L'olfactomètre à une voie s'inspire du modèle décrit par Katsoyannos *et al.* (1980). Ce dispositif permet d'étudier en situation de non-choix l'attractivité relative de chacune des modalités à tester. Deux types d'olfactomètres ont été construits dans notre laboratoire par soudure à chaud de boîtes en polycarbonate transparentes de 1000 ml (Nalgene®, Thermo Scientific, New York). La différence entre ces deux modèles concerne la chambre de stockage des mouches (Figure 10 et 11), une cage en plexiglas 40\*40\*40 cm pour le modèle A et un cylindre de 28 cm de longueur et de 11.5 cm de diamètre pour le modèle B. Le reste de l'olfactomètre (L = 56 cm) est commun aux deux modèles, avec en prolongement de la chambre de stockage des mouches, une 1ère chambre destinée au piégeage des femelles attirées (chambre de capture), et une seconde chambre (chambre à odeurs) destiné au matériel végétal. La chambre de capture est séparée de la chambre de stockage par un cône en maille aluminium empêchant le retour des mouches dans la zone de stockage, et est séparé de la chambre à odeurs par une grille. Cette chambre se termine par un ventilateur (4\*4\*2 cm, 12V, Sunon, Chine) qui fournit un flux d'air de 0.35 m.s<sup>-1</sup> depuis l'entrée de la zone de stockage des mouches. Dans la plupart des études sur les Tephritidae en olfactomètres ou en tunnels de vol la vitesse de vent est comprise entre 0.08 et 1.6 m.s<sup>-1</sup> (Mille 1994, Brévault & Quilici 2010). Dans la chambre à odeurs, les morceaux de fruits sont placés dans un contenant (panier à odeur) dont le fond est une succession de mailles de fer inclinées sous différents angles permettant le passage du flux d'air tout limitant une éventuelle attraction visuelle.

Sauf précision contraire, tous les essais en olfactomètre se déroulent selon le même protocole, seule la modalité d'odeur change. Le dispositif expérimental comprend 4 olfactomètres placés sur une paillasse et séparés par une distance de 0,5 m : 3 olfactomètres contiennent chacun 15 g du fruit à tester découpé en dés et placé dans le panier à odeur, et un olfactomètre est consacré à la modalité témoin où le flux d'air ne porte

aucune odeur. Toutes les modalités sont expérimentées sur 50 mouches femelles naïves dans l'olfactomètre A et 30 dans l'olfactomètre B, les mouches sont d'âges identiques et matures sexuellement (âgées de 20 à 40 jours) donc supposées motivées dans la recherche d'un site de ponte.

### *II-1.2. Détermination du rôle du flux d'air dans l'attraction olfactive*

Il s'agit de vérifier le rôle du flux d'air dans l'attractivité d'un stimulus olfactif et d'examiner s'il est nécessaire au déclenchement d'un déplacement orienté des mouches vers la source d'odeur. Les manipulations sont calibrées avec l'olfactomètre de type A, en testant 4 modalités : 2 modalités avec odeur de concombre de variété F1-L04 (dont une avec flux d'air et une sans flux) et 2 modalités sans odeur (dont une avec flux d'air et une sans flux).

### *II-1.3. Test de l'existence d'un phénomène de recrutement*

Les mouches piégées dans le compartiment de piégeage sont considérées comme attirées par l'odeur présentée. Néanmoins chez certains insectes (Cabrera & Jaffe 2007) une communication directe ou indirecte entre individus peut avoir lieu. Ces interactions peuvent entraîner des phénomènes de regroupement, responsables d'un biais dans les résultats. Pour s'affranchir de cet artefact, l'existence d'un éventuel effet de groupe est testée. Les manipulations sont répétées 2 fois sans odeur de fruit et avec flux d'air dans des olfactomètres de type A et 30 femelles sont placées dans les chambres de stockage. Dans chaque essai, 5 femelles sont placées dans le compartiment de piégeage de 2 olfactomètres et 10 dans le compartiment de piégeage de 2 autres olfactomètres. Le nombre de mouches entrées dans le compartiment est comptabilisé après 30 minutes afin de déterminer si la présence de mouches attire d'autres individus.

### *II-1.4. Détermination de la tranche horaire optimale pour les manipulations*

Chez les Tephritidae, les comportements de ponte et d'alimentation sont gouvernés par des rythmes circadiens et par l'intensité lumineuse (Fletcher 1987). Afin d'optimiser les essais, il convient donc de déterminer la tranche horaire pendant laquelle l'attraction olfactive est maximum. Etant donné les difficultés rencontrées, la manipulation n'a été répétée qu'une seule fois. L'attraction des mouches par le concombre de variété F1-L04 est mesurée pendant une heure et ceci pour les 6 tranches horaires suivantes : de 7h à 8h ; de 9h à 10h ; de 11h à 12h ; de 13h à 14h ; de 15h à 16h et de 17h à 18h. A chaque tranche horaire, quatre olfactomètres de type A, dont un témoin, sont disposés avec 40 femelles par cage. Les conditions lumineuses sont mesurées pour chaque olfactomètre grâce à un luxmètre au début et à la fin de l'expérimentation.

## **II-2. Les essais en petites cages**

Durant une période de deux mois, la réponse des mouches aux stimuli olfactifs dans les olfactomètres a été perturbée et l'hypothèse d'une contamination du Laboratoire de d'Ecologie Terrestre et Lutte Intégrée (LETLI) par des odeurs perturbatrices a été envisagée. De nombreuses investigations sur les causes de





**Figure 13 :** Boîtes de piégeage à couvercle grillagé et à couvercle clos



**Figure 14 :** disposition du fruit dans la boîte de piégeage



**Figure 15 :** Disposition des petites cages sur 2 étages en chambre climatique

l'échec des manipulations ont été réalisées et des néons à régulateur d'intensité lumineuse ont été installés. Certains facteurs ne pouvant être contrôlés, plusieurs dispositifs ont été conçus pour optimiser les résultats.

Ainsi, un nouveau dispositif a été mis au point afin de mesurer l'attractivité des plantes hôtes pour *B. cucurbitae*. Cette nouvelle méthode se différencie des olfactomètres par l'absence de flux d'air et la possibilité de réaliser les études dans une chambre climatique isolée avec des conditions de température et d'humidité contrôlées ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  d'humidité relative):

### *II-2.1. Description du dispositif et procédure générale*

Des petites cages d'élevage (30\*30\*30 cm) en polyester blanc (largeur de maille : 680 $\mu\text{m}$ , MegaView Science Co. Ltd, Taiwan) contenant 30 ou 40 femelles sont utilisées pour les tests. A l'intérieur de ces cages sont placées des boîtes en polypropylène (Sodico, Réunion) de 11 cm de diamètre et 8 cm de hauteur, qui ont été transformées en dispositifs de « piégeage » avec 5 ouvertures ou sont placés des tubes Eppendorff (diamètre d'ouverture : 1cm) coupés à la taille de 2 cm pour éviter la sortie des mouches qui ont pénétré dans le « piège ». Les ouvertures sont percées dans le plastique à 2 cm du fond des boîtes de sorte que les mouches ne puissent pas voir le fruit lorsqu'elles sont à l'entrée des tubes Eppendorff. Deux types de couvercles peuvent fermer le dispositif : un couvercle grillagé à mailles fines (1 mm<sup>2</sup>) permettant une diffusion plus importante de l'odeur et un couvercle totalement clos (Figure 13). Dans chaque petite cage deux boîtes sont disposées, une contenant 30 g de fruit coupé (Figure 14) et une vide (témoin). Le nombre de femelles piégées dans les boîtes est comptabilisé au bout d'un certain temps d'exposition (déterminé en II-2.4.) aux effluves des plantes hôtes.

### *II-2.2. Diffusion des effluves et choix du type de boîte*

Aucun flux d'air n'étant présent dans ce dispositif, une des questions qui se posent est de savoir si la diffusion des effluves à partir de la boîte est suffisante. C'est pourquoi deux types de couvercles (avec grillage ou clos) ont été testés. Pour chacune des 3 répétitions, 8 cages contenant 50 femelles sont utilisées selon un dispositif randomisé. Ce dernier comprend 4 petites cages avec chacune une boîte à couvercle grillagé et 4 petites cages avec chacune une boîte à couvercle clos. Pour chacune des deux modalités de couvercle, 3 cages contiennent des boîtes contenant chacune 30 g de concombre de variété Showy Green et une cage contient une boîte sans odeur (témoin). Le nombre de femelles piégées est relevé au bout de 3 heures d'exposition.

### *II-2.3. Test de l'existence d'un phénomène de recrutement*

Comme pour les manipulations en olfactomètre, l'existence d'un éventuel effet de groupe est testée. Les manipulations sont répétées 2 fois sans odeur de fruit sur 12 cages de 30 mouches. Dans chaque essai, 5 femelles sont placées dans 6 boîtes et 10 dans 6 autres boîtes. Le nombre de mouches entrées dans la boîte est comptabilisé après 2 heures pour déterminer si la présence de mouches attire d'autres individus.



**Figure 16 :** Femelle sexuellement immature après dissection



**Figure 17 :** Femelle sexuellement mature après dissection, présence d'œufs matures



**Figure 18 :** Système ovarien d'une femelle après dissection, absence d'œufs



#### *II-2.4. Influence de la position des petites cages*

Dans la chambre climatique, deux rangées horizontales et superposées de 9 cages peuvent être placées. Contrairement à la rangée inférieure, la rangée supérieure est située à proximité d'un néon (Figure 15). Deux types de dispositifs sont testés, avec une seule répétition est effectuée pour chacun d'eux. Le 1<sup>er</sup> dispositif comprend 18 petites cages sur deux rangées superposées (9 en position haute et 9 en position basse) et le 2<sup>ème</sup> dispositif comprend 12 cages sur une seule rangée en position basse. Pour les deux dispositifs, chaque cage contient 50 femelles matures (âgées de 25 à 30 jours) et deux boîtes (une boîte témoin et une boîte avec concombre de la variété « Showy Green »). L'intensité lumineuse à l'intérieur de chaque cage est mesurée grâce à un luxmètre et le nombre de femelles piégées est relevé après 3 heures d'exposition.

#### *II-2.5. Détermination de la tranche horaire optimale pour les manipulations*

Tout comme en olfactomètre à une voie, il convient de déterminer la période la plus propice à l'expression du comportement de recherche d'un site de ponte pour optimiser les essais. Etant donné les difficultés rencontrées, la manipulation n'a été répétée qu'une seule fois. L'attraction des mouches par le concombre de variété « Vantage » est mesurée pendant 2 heures et ceci pour les 4 tranches horaires suivantes : de 8h à 10h ; de 10h à 12h ; de 12h à 14h et de 14h à 16h. A chaque tranche horaire, 5 nouvelles cages, contenant une boîte renfermant le fruit et une boîte témoin, sont disposées avec 30 femelles naïves par cage. A la fin de chaque tranche horaire, les femelles entrées dans les boîtes sont comptées, les essais sont répétés 3 fois.

#### *II-2.6. Détermination de la durée optimale des manipulations*

La durée d'exposition aux odeurs nécessaire pour mettre en évidence l'attraction olfactive est évaluée. Les essais sont réalisés sur 12 cages placées sur une seule rangée (position basse) contenant 30 femelles avec du concombre de la variété Showy Green dans chaque boîte. Le nombre de mouches piégées est relevé toutes les heures pendant 5h.

### **III-Etude de l'influence de certains paramètres physiologiques des femelles sur leur réponse comportementale**

Dans le cas des *Dacini*, comme chez *N. cyaneus*, la recherche d'une plante hôte est conditionnée par la maturité sexuelle qui est susceptible d'influencer la motivation des femelles à pondre (Brévault & Quilici 1999). Il convient donc de tester l'influence de l'âge des mouches et de leur charge en œufs sur leur réponse comportementale pour déterminer le stade de développement auquel les femelles répondent le mieux. L'attraction par le concombre de la variété « F1-L04 » est testée pour 4 âges différents : individus âgés de 5 jours (sexuellement immatures), de 15 jours (acquisition de la maturité sexuelle), de 25 jours (sexuellement matures) ou de 35 jours (mouches âgées). Le dispositif expérimental comprend 12 petites cages de 30 femelles (3 cages par âge). Le nombre de mouches piégées est comptabilisé au bout de 2 heures et l'essai est répété 3 fois. De plus, à l'issue de chaque répétition l'ensemble des mouches piégées et 10 mouches de chaque cage n'ayant pas répondues est conservé dans l'alcool puis disséquées pour dénombrer les œufs



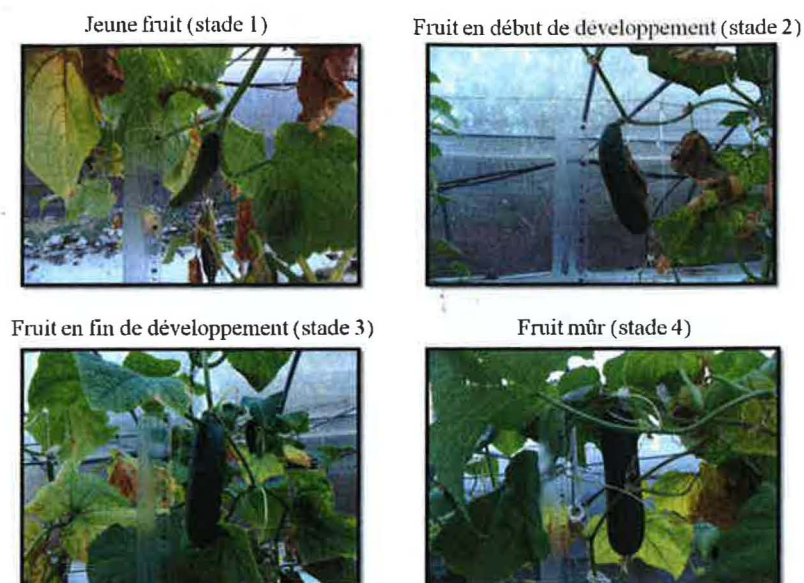


Figure 19 : Evolution du concombre « Vantage » selon les stades phénologiques.

Tableau 1 : Caractéristiques du fruit du concombre variété « Vantage » pour définir les 4 stades de maturité.

Stade	Nombre de jours après nouaison (± 1 jour)	Taille T (en cm)	Poids P (en g)
Jeune fruit (1)	5	$5 < T \leq 10$	$30 < P \leq 80$
Fruit en début de développement (2)	10	$10 < T \leq 15$	$80 < P \leq 160$
Fruit en fin de développement (3)	17	$T > 15$	$160 < P \leq 450$
Fruit à maturité (4)	25	$T > 15$	$450 < P \leq 900$

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes espèces de Cucurbitaceae testées au stade mûr.

Espèce	Nom vernaculaire	Cultivée (C)/ Sauvage (S)	Hôte (H)/ Non hôte (NH)	Poids P (en g)	Stade phénologique
<i>Luffa cylindrica</i>	Pipangaille lisse	C	H	$200 < P < 250$	3
<i>Cucumis sativus</i>	Concombre	C	H	$220 < P < 300$	3
<i>Citrullus lanatus</i>	Pastèque	C	H	3800	3
<i>Momordica charantia</i>	Margose	C	H	$50 < P < 90$	3
<i>Momordica charantia</i>	Margose	S	H	$15 < P < 30$	3
<i>Momordica charantia</i>	Margose de l'Inde	C	H	$30 < P < 60$	3
<i>Cucumis melo</i>	Melon	C	H	550	3
<i>Luffa acutangula</i>	Pipangaille à côte	C	H	$120 < P < 160$	3
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	Patole	C	H	830	3
<i>Cucurbita moschata</i>	Citrouille péi	C	H	365	3
<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette	C	H	$200 < P < 250$	3
<i>Vitis vinifera</i>	Raisin	C	NH	570 (grappe)	3

matures contenus dans les ovaires. Les femelles sont classées selon le nombre d'œufs contenus dans leurs ovaires (Figure 16, 17 et 18).

#### IV-Mesure de l'attractivité relative de différents fruits.

##### IV-1. Etude de l'attractivité olfactive du concombre à différents stades phénologiques

La concentration en composés volatils varie en fonction de l'organe de la plante et de son stade phénologique, ce qui peut influencer sur les préférences trophiques (Schoonhoven *et al.* 1998). Nous avons choisi de comparer l'attractivité de 4 stades de maturité d'un même fruit-hôte (Figure 19), en utilisant le concombre (variété « Vantage ») en comptant le nombre de femelles piégées après 2h d'exposition aux odeurs. Les caractéristiques des fruits utilisées pour définir ces 4 stades sont le temps de récolte après nouaison, la longueur et le poids du fruit, les détails sont donnés dans le tableau 1. A noter que ces caractéristiques sont spécifiques au concombre de variété « Vantage » car l'évolution de la taille et du poids des fruits varie selon l'espèce et selon la variété du fruit.

##### IV-2. Comparaison de l'attractivité de différents fruits-hôtes

Il s'agit ici de tester l'attractivité de différents fruits hôtes et de vérifier l'absence d'attraction par un fruit non hôte. Les fruits hôtes cultivés testés sont : la pastèque de variété « Baby Doll » (*Citrullus lanatus* Thunb. Matsum & Nakai), le pipangaille lisse (*Luffa cylindrica* L.), le pipangaille à côte (*Luffa acutangula* L. Roxb.), le patole (*Trichosanthes cucumerina* L.), la citrouille, le melon (*Cucumis melo* L.), la courgette, la margoise cultivée (*Momordica charantia* L.) et la margoise de l'Inde (*Cyclanthera pedata* Scrabs) et le concombre de variété « Showy Green ». Le fruit hôte sauvage testé est la margoise sauvage (*Momordica charantia* L.) et le fruit non hôte est le raisin de variété « Red Globe » (*Vitis vinifera* L.). Tous les fruits sont récoltés et testés au stade en fin de développement (stade 3), les caractéristiques des fruits sont détaillées dans le tableau 2. L'attraction des femelles pour chaque fruit est mesurée au bout de 2 heures d'exposition dans 12 petites cages avec 30 femelles par cage et 30 g de fruit coupé dans chaque boîte.

#### V-Méthodes d'analyse

Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (version 2.15.0, R Development Core Team, 2012, Vienna, Austria) et le seuil d'erreur des tests est fixé à 5%. Un test est dit significatif si la *p*-value est comprise entre 0.05 et 0.01, hautement significatif pour une *p*-value comprise entre 0.01 et 0.001, et très hautement significatif pour une *p*-value inférieure à 0.001.

##### V-1. Méthode d'analyse des résultats en olfactomètre à une voie

Pour savoir si le flux d'air, si la présence de mouches dans le compartiment de piégeage et si l'heure de la manipulation influencent la réponse des femelles, les résultats d'expérimentations sont étudiés à travers des modèles linéaires généralisés (GLM) avec comme fonction de distribution, la distribution binomiale et



comme fonction de lien, la fonction logistique. Le modèle est fondé sur le nombre de mouches attirées dans les boîtes de piégeage qui suit une loi binomiale. Un modèle quasi binomial peut-être envisagé en cas de sur-dispersion des données. La significativité des effets est testée par un test de rapport de vraisemblance basé sur le test du Chi-Deux, ou sur le test de Fischer-Snedecor dans le cas où les données sont sur-dispersées. Si le test est significatif, au moins une des modalités du facteur étudié présente une probabilité moyenne d'attirer les mouches différente des autres modalités. Un test de comparaison de moyennes deux à deux basé sur la méthode de Tukey est alors réalisé pour déterminer quelle modalité diffère des autres.

#### IV-2. Méthode d'analyse des résultats en dispositif de piégeage

✓ Il s'agit dans un premier temps de déterminer le nombre optimal de cages à tester pour obtenir une bonne répétabilité de la méthode. Pour cela, une approche statistique et théorique est utilisée: la méthode des intervalles de confiance exacts. Les conditions expérimentales sont telles que lors d'un essai au maximum 12 cages sont testées avec au maximum 400 femelles. Il faut donc identifier le nombre de cages optimal pour avoir une variabilité des résultats acceptable et un intervalle de confiance le plus restreint possible et constant pour tous les niveaux d'attractivité des fruits.

##### *Méthodes des intervalles de confiance exacts :*

Pour chaque pourcentage attendu de réponse des femelles (de 5 à 90% par pas de 5%), pour entre une et douze cages et pour un effectif de 30 ou de 40 femelles par cage, l'intervalle de confiance théorique est calculé selon la méthode de Clopper et Pearson (Clopper & Pearson 1934), basée sur la relation entre la loi binomiale  $B(n,p)$  et la loi bêta (fonction `binom.test`) :

$$\left\{ \theta \mid P [\text{Bin} (n; \theta) \leq X] \geq \alpha/2 \right\} \cap \left\{ \theta \mid P [\text{Bin} (n; \theta) \geq X] \geq \alpha/2 \right\}$$

Où  $X$  est le nombre de succès observés dans l'échantillon et  $\text{Bin} (n; \theta)$  correspond à la distribution binomiale de  $n$  essais et de probabilité de succès  $\theta$ .

De manière théorique, la variation de l'intervalle de confiance est la plus large pour une probabilité attendue de 50 % de femelles attirées. C'est à partir de 50 % de réponse que le nombre de cages optimum est choisi en comparant l'intervalle de confiance avec les populations de 30 et de 40 mouches afin de garantir des intervalles de confiance les plus fins possibles pour des fruits plus ou moins attractifs. La variabilité aux autres pourcentages de réponse possibles est également vérifiée. A noter que sur le nombre de cages choisi, il faut envisager la présence de cages où un problème inattendu peut survenir et donc prévoir une marge de cages à éliminer des résultats.

✓ Lors d'une manipulation, certaines répétitions peuvent avoir des niveaux de réponse olfactive extrêmes, qu'il conviendra d'exclure des analyses pour ne pas fausser la moyenne d'attractivité. Pour exclure ces valeurs, un test de validation croisée est réalisé. Cette méthode est basée sur une loi binomiale  $B(n,p)$  où  $n$  correspond à l'effectif de la population testée et  $p$  à la probabilité de réponse. Dans ce test, une boîte  $i$  est enlevée du jeu de donnée puis la probabilité moyenne  $p-i$  est calculée sur  $(n-1)$  boîtes (toutes les



**Tableau 3 : Pourcentage moyen (et écart type) de mouches attirées dans l'olfactomètre de type A en présence ou en absence de flux d'air et en présence ou en absence d'odeur de concombre (30g).** La manipulation, répétée 3 fois, est réalisée sur un total de 50 femelles par olfactomètre avec un olfactomètre par modalité. Les moyennes ayant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5% (Test de Tukey).

Modalité	Pourcentage moyen de réponse ± écart type
Sans odeur, sans flux d'air	0.17 ± 0.29 <sup>b</sup>
Sans odeur, avec flux d'air	0 ± 0 <sup>b</sup>
Avec odeur, sans flux d'air	0 ± 0 <sup>b</sup>
Avec odeur, avec flux d'air	7.33 ± 1.15 <sup>a</sup>

boîtes moins la boîte i). Ensuite, pour chaque boîte i, un test binomial est réalisé avec pour hypothèses :  $H_0: p_i = p-i$  contre  $H_1: p_i \neq p-i$ , où  $p_i$  est l'estimation de la probabilité d'être attirée dans la boîte i, avec i variant de 1 au nombre total de boîtes. Lorsque la  $p$ -value d'une boîte est inférieure à 0,05 elle est considérée comme ne suivant pas la même loi de distribution que les autres. Parmi les boîtes de  $p$ -value < 0,05, celle qui a la  $p$ -value la plus faible est exclue en premier lieu du jeu de données, puis cette méthode de validation croisée est relancée sur les boîtes restantes.

✓ Enfin, afin de déterminer le modèle de piège le plus adapté à l'étude, pour savoir si l'emplacement des cages (et donc la luminosité moyenne) influe sur la réponse comportementale des femelles, pour déterminer la durée et la tranche horaire optimale des manipulation, pour savoir si la présence de mouches dans le compartiment de piégeage, pour évaluer l'influence de la maturité sexuelle sur la réponse des femelles, pour évaluer l'influence du stade phénologique du fruit sur son attractivité et pour comparer l'attraction des mouches par différents fruits, les résultats d'expérimentations sont analysés à l'aide de modèles linéaires généralisés (GLM) avec comme fonction de distribution la distribution binomiale ou quasi binomiale et, comme fonction de lien, la fonction logistique. La significativité des effets est testée de la même manière que pour les résultats d'olfactométrie.

✓ Un modèle linéaire généralisé ne pouvant être utilisé pour évaluer l'influence de la charge en œufs sur la réponse des femelles, le nombre d'œufs moyen par femelle est comparé en fonction de l'âge et de la réponse grâce à un test de comparaison multiple de Wilcoxon avec un ajustement de Benjamini & Hochberg (1995).

## Résultats

### I - Choix du dispositif expérimental

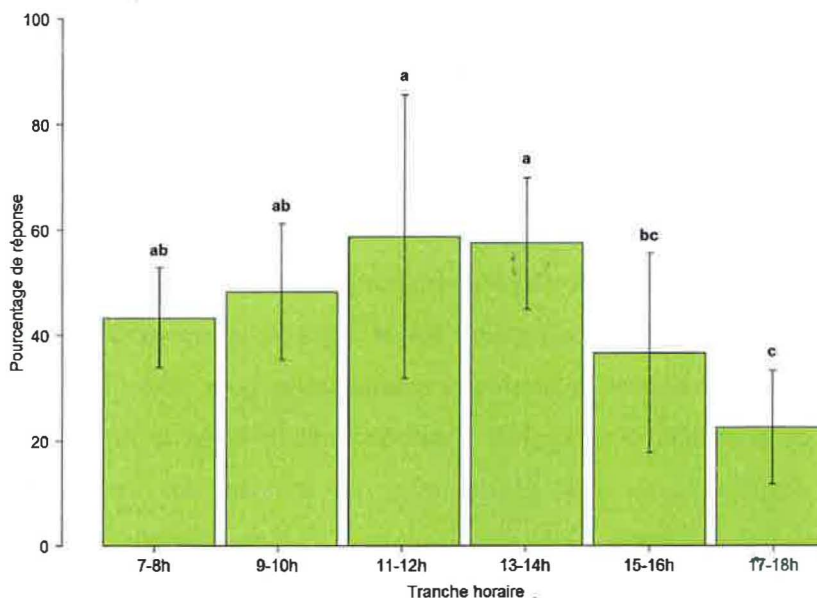
#### I-1. Essais en olfactomètre à une voie

##### *I-1.1. Détermination du rôle du flux d'air dans l'attraction olfactive*

Le test de rapport de vraisemblance (Khi-deux) indique que la modalité influence de manière très hautement significative l'attraction des femelles pour le concombre ( $p$ -value =  $2.10^{-6}$ ). Selon le test de Tukey, la réponse des femelles de *B. cucurbitae* en présence d'un flux d'air associée aux effluves de concombre est significativement supérieure aux trois autres modalités (Tableau 3). En l'absence de flux d'air les mouches ne localisent pas la source d'odeur. C'est donc la combinaison du flux d'air et des effluves qui permet le déclenchement d'un déplacement orienté des mouches vers la source d'odeur.

##### *I-1.2. Test de l'existence d'un phénomène de recrutement*

La présence de mouches dans le compartiment de piégeage n'a attiré aucun autre individu. On considère donc qu'il n'existe pas de phénomène de recrutement dans ce dispositif.



**Figure 20 : Pourcentage moyen (et intervalle de confiance asymptotique) de mouches attirées dans un olfactomètre de type A par l'odeur de concombre en fonction de la tranche horaire de la journée.** La manipulation est répétée une fois sur un total de 40 femelles par olfactomètre avec 30g de concombre. Par tranche horaire, 4 olfactomètres dont un témoin sont utilisés. Les lettres représentent les groupes des différentes modalités selon le modèle GLM appliqué, ainsi les moyennes ayant au moins une lettre en commun ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

**Tableau 4 : Pourcentage moyen (et écart type) de mouches attirées dans les boîtes avec 2 types de couvercle (grillagé et clos).**La manipulation, répétée 3 fois, est réalisée avec 4 cages contenant le modèle de boîtes à couvercle grillagé et 4 contenant le modèle de boîtes à couvercle clos, toutes renferment 50 femelles. Toutes les boîtes contiennent 30 g de concombre à l'exception de 4 boîtes témoins de chaque modèle. Les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test du Khi<sup>2</sup>) selon le modèle GLM appliqué.

Modalité	Pourcentage moyen de réponse ± écart type
Boîte à couvercle fermé	69.3 ± 5.46 <sup>a</sup>
Boîte à couvercle grillagé	71.3 ± 8.06 <sup>a</sup>

**Tableau 5 : Pourcentage moyen de réponse olfactive en petites cages et écart type en fonction de la position des cages et de la luminosité.** L'essai est répété une fois sur un total de 9 cages en position basse et 9 cages en position haute, contenant chacune 30 femelles et 30 g de concombre. Les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test du Khi<sup>2</sup>).

Modalité	Luminosité moyenne (lux) ± écart type	Pourcentage moyen de réponse ± écart type	Etendue des écarts types sur les pourcentages de réponse issus de 1000 simulations de 9 cages
Position haute	4005± 286	56.22 ± 30.65 <sup>a</sup>	3.71 à 10.17
Position basse	2336± 122	55.11± 12.17 <sup>a</sup>	3.76 à 10.19



### *1-1.3. Détermination de la tranche horaire optimale pour les essais*

Le test de rapport de vraisemblance (Khi-deux) indique que la tranche horaire a une influence très hautement significative sur l'attraction des femelles pour le concombre ( $p\text{-value} = 1.33 \cdot 10^{-6}$ ). Le pourcentage de réponse entre 13h et 14h est supérieur à celui des autres tranches horaires, mais pas de manière significative ( $p\text{-value} > 0.05$ ) avec le taux de réponse entre 11h et 12h ; il n'est significativement supérieur qu'à celui des tranches horaires de l'après midi (de 15h à 16h  $p\text{-value} < 0.01$  et de 17 à 18h  $p\text{-value} < 0.001$ ). Néanmoins l'attraction des femelles durant les 2 premières tranches horaires testées (de 7h à 8h et de 9h à 10h) n'est pas significativement supérieure à celle mesurée pendant la tranche horaire de 15 à 16h ( $p\text{-value} > 0.05$ ) (Figure 20). Le pourcentage de réponse entre 17h et 18h est inférieur à celui des autres tranches horaires de manière significative ( $p\text{-value} < 0.05$ ). Nous avons donc choisi de réaliser les essais ultérieurs entre 9h et 14h, période pendant laquelle le niveau de réponse est le meilleur.

## **1-2. Essais en petites cages**

### *1-2.1. Diffusion des effluves et choix du type de boîte*

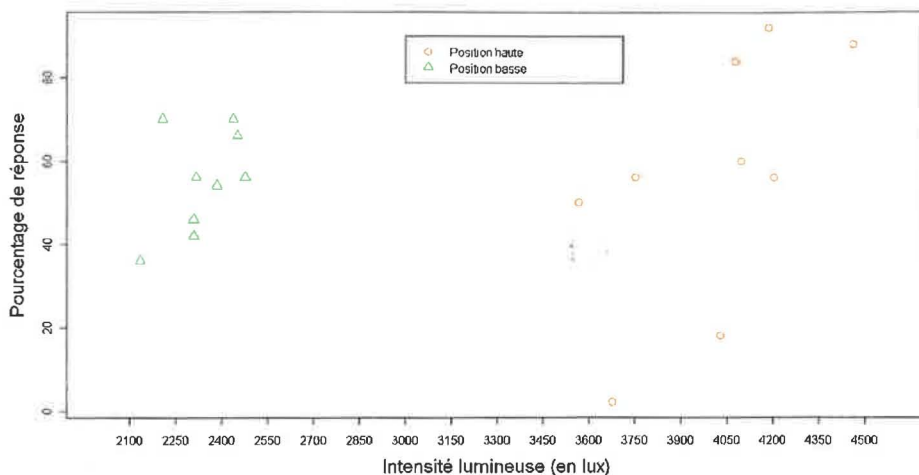
La réponse olfactive des femelles n'est pas significativement différente selon le type de couvercle utilisé ( $p\text{-value} = 0.39$ , Tableau 4). Les boîtes à couvercle clos et celles à couvercle grillagé permettent donc une diffusion d'effluves suffisante pour déclencher une réponse comportementale. A potentiel d'attraction égal, le modèle fermé a été retenu car il permet de s'affranchir complètement d'une éventuelle attraction visuelle.

### *1-2.2. Test de l'existence d'un phénomène de recrutement*

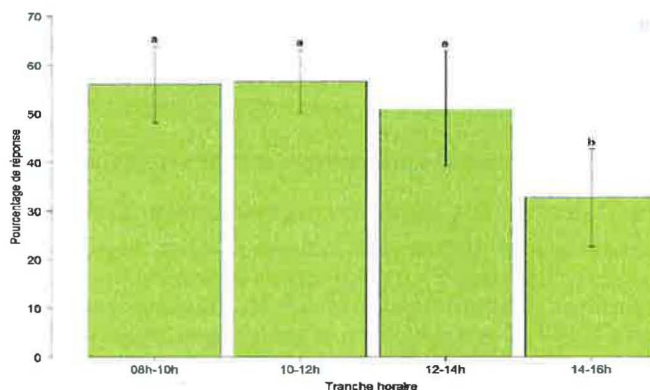
La présence de mouches dans la boîte de piégeage n'a attiré aucun autre individu. On considère donc qu'il n'existe pas de phénomène de recrutement dans ce dispositif.

### *1-2.2. Influence de la position des petites cages sur la variabilité des résultats*

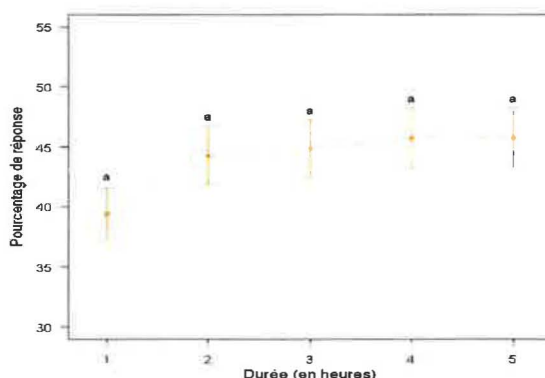
Selon le test de rapport de vraisemblance, la position (haute ou basse) des boîtes n'a pas d'influence sur le pourcentage moyen d'attraction ( $p\text{-value} = 0.78$ ). Néanmoins une différence importante d'écarts types est observée entre les 2 échantillons (Tableau 5), le pourcentage moyen de réponse en position haute ayant un écart type 2 fois plus élevé (30.65 %) que celui observé en position basse (12.17 %). L'étendue des écarts types théoriques est calculée pour les lois binomiales  $B(9, 0.55)$  et  $B(9, 0.56)$  respectivement pour les positions basse et haute. Les écarts types observés se situent en dehors des intervalles de confiance théoriques, ce qui signifie qu'il y existe une sur-dispersion des résultats dans les deux positions (Tableau 5). Afin d'identifier les cages responsables de la sur-dispersion des données dans les 2 positions, la probabilité que chacune d'entre elles suive la même loi binomiale que la population a été testée (fonction `rbinom`). Le nombre de cages ne suivant pas la loi binomiale de chaque population est de 1 sur 9 en position basse (0.29 % de probabilité d'appartenir à la loi binomiale de la population) contre 5 sur 9 en position haute (<0.1% de probabilité d'appartenir à la loi binomiale de la population). Ainsi, la position basse permet d'avoir un nombre de cages à intégrer dans le modèle d'estimation de l'attraction olfactive deux fois plus important



**Figure 21 : Pourcentage de mouches attirées dans les boîtes par l'odeur de concombre, en fonction de l'intensité lumineuse et de la position haute ou basse des boîtes.** La manipulation est répétée une fois sur un total de 9 cages dans chaque position contenant chacune 30 femelles et 30 g de fruit dans chaque boîte.



**Figure 22 : Pourcentage moyen de mouches attirées par l'odeur de concombre dans le dispositif de petites cages en fonction de la tranche horaire de la journée et intervalle de confiance asymptotique.** La manipulation est répétée une fois sur un total de 30 femelles par cage. Par tranche horaire, 5 cages sont utilisées avec chacune une boîte contenant 30 g de concombre. Les lettres représentent les groupes des différentes modalités selon le modèle GLM appliqué, ainsi les moyennes ayant au moins une lettre en commun ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).



**Figure 23: Evolution du pourcentage moyen de mouches attirées par l'odeur de concombre, en fonction de la durée de la manipulation, et intervalle de confiance asymptotique écart type associé.** L'essai est répété une fois sur un total de 12 cages contenant 30 femelles et 30 g de fruit par boîte. Les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

qu'en position haute. C'est pourquoi, pour la suite des essais en petites cages, ces dernières sont placées en position basse. Néanmoins, l'existence d'une éventuelle sur-dispersion des données dans cette position implique la nécessité d'un test de validation croisée permettant d'exclure les cages dont les niveaux de réponse ne suivraient pas la loi binomiale du modèle appliqué.

Afin d'expliquer la différence de variabilité des réponses selon la position, le facteur luminosité (mesurée en lux) a été considéré. En effet, la forte variabilité des résultats observée en position haute est en lien avec la luminosité. Dans cette position, l'intensité lumineuse est en moyenne 2 fois plus importante qu'en position basse (Tableau 5) tout comme les écarts types et également 2 fois plus variable (1000 lux de variation en position haute contre 400 lux en position basse) (Figure 21). Néanmoins, ce facteur n'est pas le seul explicatif car pour une même intensité lumineuse des pourcentages de réponse très variables sont observés (Figure 21).

### *I-2.3. Détermination de la tranche horaire optimale pour les manipulations*

Le test de rapport de vraisemblance (Khi-deux) indique que dans ce dispositif de petites cages, la tranche horaire a une influence très significative sur l'attraction des femelles vers l'odeur de concombre ( $p$ -value < 0.01). Les pourcentages de réponse entre 8h et 10h, entre 10h et 12h et entre 12 et 14h ne diffèrent pas de manière significative ( $p$ -value > 0.05) (Figure 22). De plus, ces 3 tranches horaires présentent un taux d'attraction olfactive supérieur à celui observé de 14h à 16 h de manière significative ( $p$ -value < 0.05). Les essais ultérieurs peuvent donc être mis en place entre 8h et 14h, période où la réponse olfactive lors de la recherche d'un site de ponte est maximale.

### *I-2.4. Durée optimale des manipulations*

La durée des manipulations n'a pas d'effet significatif sur la réponse olfactive des femelles ( $p$ -value = 0.43). Néanmoins, on observe une tendance à l'augmentation du nombre de femelles attirées dans les boîtes entre la première et la deuxième heure (Figure 23). Par mesure de précaution, nous avons donc choisi une durée d'exposition de 2 heures aux odeurs pour toutes les manipulations en petites cages.

### *I-2.5. Nombre optimal de cages pour une bonne répétabilité de la méthode*

L'intervalle de confiance (IC) théorique du pourcentage de réponse (de 5% à 95% par pas de 5%), a été calculé pour toutes les combinaisons possibles entre le nombre de cages (de 1 à 12) et le nombre de femelles par cage (30 ou 40). Les résultats sont présentés pour un taux de réponse moyen attendu de 50 %, car c'est à ce niveau de réponse que l'étendue de l'IC est la plus large, ce qui signifie que les résultats risquent d'être les plus variables. On se place donc à ce niveau de réponse pour sélectionner le nombre de cages permettant d'avoir une étendue de l'IC la plus faible possible pour un nombre de femelles de 30 et de 40 par cage. Compte tenu des restrictions dues à la production de mouches (400 mouches par essai), au maximum 10 cages contenant 40 mouches ou 12 cages contenant 30 mouches peuvent être utilisées dans le dispositif. Avec 40 mouches par cage, la variation de l'étendue de l'IC est faible entre un dispositif à 10 et à 9 cages (respectivement 10.02 et 10.57). La variation de l'étendue de l'IC est équivalente pour un dispositif à 12 et à



Tableau 6 : Intervalle de confiance (IC) théorique calculé selon la méthode de Clopper et Pearson pour un pourcentage de réponse moyen attendu de 50%, pour 7 à 12 cages et pour 40 ou 30 femelles par cage.

Nombre de femelles par cage	Nombre de cages	Etendue de l'IC (%)	Nombre total de femelles pour la manipulation
40	10	10.02	400
	9	10.57	360
	8	11.22	320
	7	12.02	280
30	12	10.57	360
	11	11.05	330
	10	11.60	300
	9	12.24	270

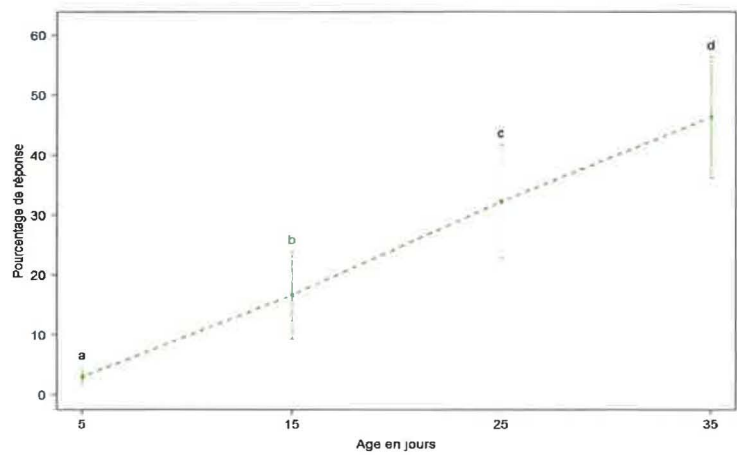


Figure 24 : Pourcentage moyen (et intervalle de confiance asymptotique) de mouches attirées par l'odeur de concombre en petites cages en fonction de l'âge. L'essai est répété 3 fois sur un total de 12 cages (3 cages par âge) contenant chacune 30 femelles et 30 g de fruit. Les lettres représentent les groupes des différentes modalités selon le modèle GLM appliqué, ainsi les moyennes ayant au moins une lettre en commun sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

11 cages de 30 mouches (respectivement 10.57 et 11.05). Pour un nombre total de mouches utilisées de 360 et une étendue de l'IC de 10.57, deux types de dispositifs sont possibles : 9 cages à 40 mouches ou 12 cages à 30 mouches (Tableau 6). Le dispositif à 12 cages de 30 femelles a donc été retenu, car il permet d'effectuer trois répétitions (cages) de plus par rapport à l'autre dispositif. Ceci permet de conserver une étendue de l'IC correcte même dans le cas où plusieurs cages sont éliminées par validation croisée.

## **II - Etude de l'influence de certains paramètres physiologiques des femelles sur leur réponse comportementale**

### **II-1. Influence de l'âge**

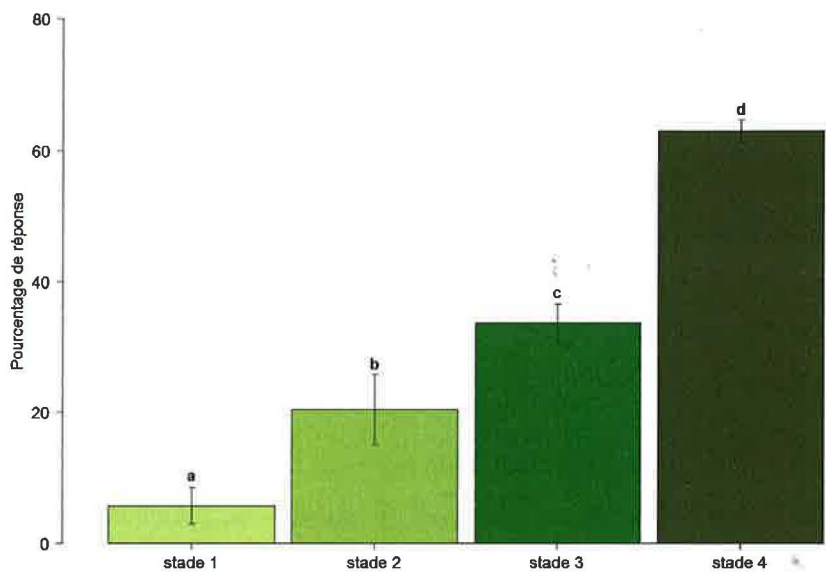
Le test de rapport de vraisemblance (Khi-deux) indique que l'âge des femelles a une influence très hautement significative sur leur réponse aux effluves de concombre ( $p\text{-value} = 2.10^{-16}$ ). L'attraction olfactive augmente avec l'âge des femelles et on relève des différences significatives entre les niveaux de réponse des femelles de tous les âges testés (Figure 24). Dans ces essais, les femelles âgées de 5 jours sont sexuellement immatures et présentent un taux de réponse négligeable ( $< 3\%$ ). Le pourcentage de réponse aux stimuli olfactifs à cet âge présente des différences très hautement significatives avec le pourcentage de réponse de femelles plus âgées ( $p\text{-value} < 0.001$ ). La proportion de femelles de 15 jours qui répondent à l'odeur ( $16.7\% \pm 7.0$ ) est inférieure de manière hautement significative ( $p\text{-value} < 0.01$ ) à celle observée à 25 jours ( $32.2\% \pm 12.3$ ) et de manière très hautement significative ( $p\text{-value} < 0.001$ ) à celle observée à 35 jours ( $46.3\% \pm 13.17$ ). Enfin, le pourcentage de réponse des femelles de 35 jours aux stimuli olfactifs est supérieur de manière hautement significative ( $p\text{-value} < 0.01$ ) à celui des femelles de 25 jours.

### **II-2. Influence de la charge en oeufs**

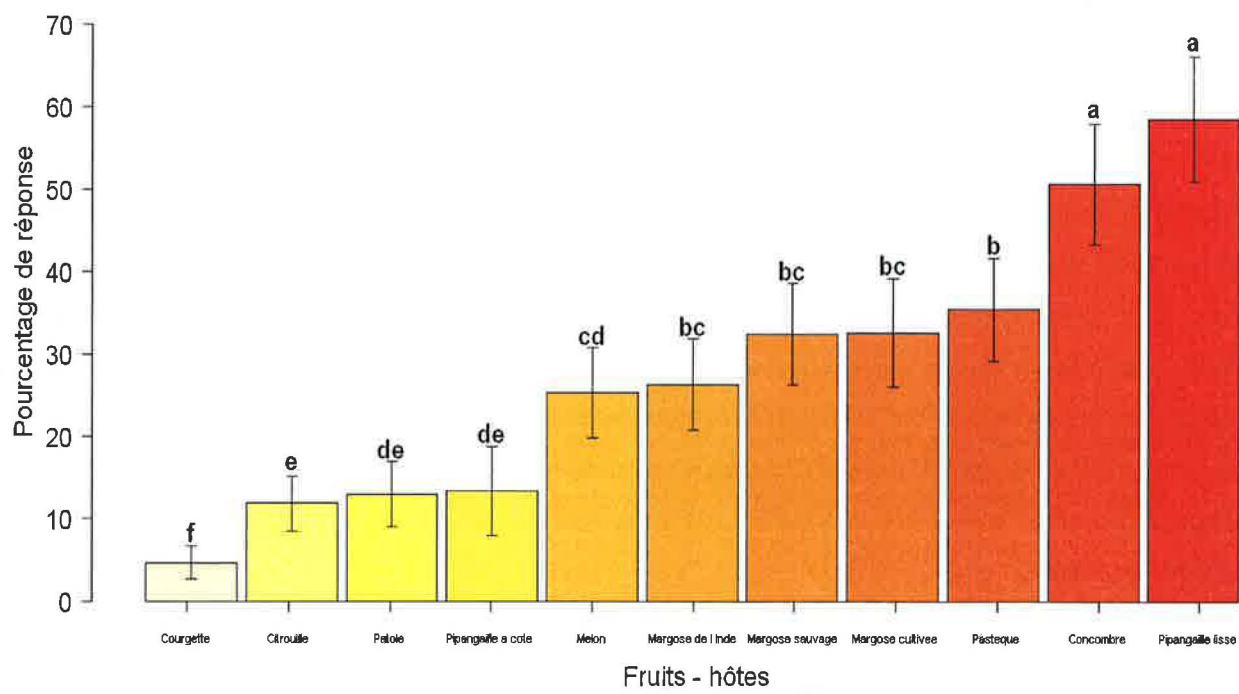
Le nombre d'œufs comptabilisés par femelle varient entre 0 et 96 œufs. Afin de faciliter l'interprétation, les charges en œufs ont été réparties en 10 classes de 10 œufs. En annexe 4 le pourcentage de femelles observées pour chacune des 10 classes de charge en œufs, en fonction de l'âge et de la réponse est représenté. Pour tous les âges et quelque soit la réponse olfactive (réponse ou non), la charge en œuf est très hétérogène avec tout de même une moyenne d'œufs par femelle proche de 30. Pour toutes femelles gravides (charge en œufs  $> 0$ ) le profil de réponse (réponse ou non) ne diffèrent pas selon la charge en œufs. Globalement la réponse olfactive des femelles n'est donc pas sous l'influence directe du nombre d'œufs présent dans les ovaires.

### **II-3. Influence de l'interaction entre la charge en œufs et l'âge**

Le test de Wilcoxon indique que la charge en œuf ne diffère pas significativement selon l'âge des femelles et le profil de réponse (Annexe 4) sauf pour le couple (femelles de 25 jours/pas de réponse et femelles de 35 jours/avec réponse) ( $p\text{-value} < 0.001$ ).



**Figure 25 : Pourcentage moyen (et intervalle de confiance asymptotique) de mouches attirées par l'odeur de concombre en petites cages selon 4 stades phénologiques.** La manipulation, répétée 3 fois, est réalisée avec 12 cages de 30 femelles (4 cages pour chaque stade phénologique). Toutes les boîtes renferment 30 g de concombre à l'exception d'une boîte témoin dans chaque cage. Les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey) selon le modèle GLM appliqué.



**Figure 26 : Pourcentage moyen (et intervalle de confiance asymptotique) de mouches attirées par l'odeur de différents fruits hôtes en petites cages.** L'essai est répété une fois pour chaque fruit sur un total de 12 cages contenant chacune 30 femelles et 30 g de fruit. Les lettres représentent les groupes des différentes modalités selon le modèle GLM appliqué, ainsi les moyennes ayant au moins une lettre en commun sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).



### III - Mesure de l'attractivité relative de différents fruits.

#### III – 1. Etude de l'attractivité olfactive du concombre à différents stades phénologiques

Le test de rapport de vraisemblance (Khi-deux) indique que le stade de développement du concombre a une influence très hautement significative sur la réponse des femelles aux effluves de concombre ( $p$ -value =  $2 \cdot 10^{-16}$ ). L'attraction olfactive augmente en fonction de la maturité du fruit et plus le stade phénologique est avancé, plus le pourcentage de femelles ayant répondu augmente (Figure 25). Le pourcentage d'attraction olfactive du concombre de stade 1 ( $5.71 \pm 3.71\%$ ) est inférieur à celui de tous les autres de manière très hautement significative ( $p$ -value < 0.001). Le concombre de stade 2 attire un nombre de femelles ( $20.48 \pm 7.05\%$ ) inférieur au concombre de stade 3 ( $33.70 \pm 4.23\%$ ) de manière hautement significative ( $p$ -value < 0.01). Le taux d'attraction des femelles pour le concombre de stade 4 ( $62.96 \pm 2.62\%$ ) est le plus élevé et diffère des autres pourcentages d'attraction de manière très hautement significative ( $p$ -value < 0.001) (Figure 25).

#### III – 2. Comparaison de l'attractivité de différents fruits

La pipangaille lisse et le concombre de variété « Showy Green » présentent les plus forts taux d'attraction olfactive pour les femelles matures (respectivement 58.5 % et 50.6 %, Annexe 5). La pastèque, les 3 types de margose (sauvage, cultivée et lisse) et le melon, présentent une attractivité intermédiaire (respectivement 35.4 %, 32.6%, 32.4 %, 26.3 % et 25.3%). On constate que le pourcentage de réponse des femelles varie très peu entre l'espèce sauvage et les espèces cultivées de margose (variété Naja et margose lisse) (Annexe 5). Enfin, l'attraction olfactive de la pipangaille à côte, du patole, de la citrouille et de la courgette est faible (<15%) (Annexe 4). Le nombre de cages à éliminer selon la méthode de validation croisée est satisfaisant (< 3 cages) pour tous les essais sauf dans les cas de la pastèque, du patole et de la pipangaille à côte (Annexe 5).

Le test de rapport de vraisemblance (Khi-deux) indique que l'espèce de fruit hôte a une influence très hautement significative sur l'attraction des femelles ( $p$ -value <  $2 \cdot 10^{-16}$ ). Le raisin, fruit non hôte, n'a attiré aucune mouche dans les dispositifs. Les pourcentages de réponse à l'odeur de la pipangaille lisse et à celle du concombre sont significativement supérieurs aux pourcentages obtenus avec les autres fruits ( $p$ -value < 0.05) et ne diffèrent pas de manière significative entre eux ( $p$ -value = 0.96) (Figure 26). Le pourcentage d'attraction de la pastèque est supérieur de manière non significative ( $p$ -value = 0.99) à ceux de la margose sauvage et de la margose cultivée, dont l'attractivité ne diffère pas significativement entre elles ( $p$ -value = 1.00). L'attraction des femelles pour ces deux derniers fruits est supérieure à l'attraction du melon, quoique de manière non significative ( $p$ -value = 0.28) (Figure 26). Les pourcentages de réponse à l'odeur de pipangaille à côtes et à l'odeur de patole ne diffèrent pas significativement entre eux ( $p$ -value = 1.00) et ne diffèrent pas du pourcentage de mouches attirées par l'odeur de melon ( $p$ -value = 0.06) bien qu'ils y soient tous deux inférieurs. L'attraction olfactive de la citrouille est inférieure à celle du patole et de la pipangaille

à côtes de manière non significative ( $p$ -value = 1.00) mais elle est significativement supérieure à celle de la courgette ( $p$ -value < 0.05) qui présente le pourcentage de réponse le plus faible parmi les fruits-hôtes testés.

## DISCUSSION

### I – Apports méthodologiques et dispositifs expérimentaux

L'attraction olfactive des insectes peut être étudiée grâce à différents dispositifs expérimentaux utilisant de l'air en mouvement ou non. Dans notre étude, deux types de dispositifs ont été testés afin de mettre en place un protocole pertinent pour quantifier l'attraction olfactive de *B. cucurbitae* pour différentes plantes hôtes.

Les essais en olfactomètre à une voie ont permis de mettre en évidence que, dans ces dispositifs, la présence d'un flux d'air est nécessaire au déclenchement du déplacement orienté des mouches vers la source d'odeur. Les femelles s'orientent donc vers le concombre grâce à un phénomène d'anémotaxie positive conditionnée par l'odeur. Brévault & Quilici (2009a, 2010) ont également démontré en tunnel de vol l'existence d'une anémotaxie positive conditionnée par l'odeur de tomate chez un autre Tephritidae, *N. cyaneescens*. Dans les olfactomètres, une distance modérée (56·cm) sépare les femelles de la source d'odeur et les odeurs de concombre doivent être dispersées grâce au vent sous forme de panache jusqu'à l'insecte pour déclencher un phénomène d'orientation. Brévault & Quilici (2010) précisent qu'une vitesse de vent de  $0.35\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  est optimale pour déclencher une réponse olfactive de *N. cyaneescens* en tunnel de vol. La même vitesse de vent qui s'est révélée adaptée à *B. cucurbitae* dans nos essais. En petites cages, la diffusion passive des effluves de concombre à très courte distance est suffisante pour déclencher une attraction chez les femelles de *B. cucurbitae*. Dans le cas d'un comportement orienté par un gradient d'odeur sans flux d'air, on parle de chémotaxie. Au final, il est donc possible que les signaux olfactifs interviennent à plusieurs niveaux chez *B. cucurbitae* : (i) à distance et par anémotaxie conditionnée par l'odeur pour la recherche du site de ponte et (ii) à proximité du fruit par chémotaxie en combinaison avec d'autres types de stimuli (tactiles, visuels..) pour choisir, une fois sur la plante hôte, le fruit le plus approprié pour la ponte.

Divers insectes présentent des comportements coopératifs et, qu'il s'agisse d'interactions directes ou de communications de type chimique, ils peuvent alors montrer des réponses collectives (Nicolis 2003). Dans nos dispositifs, l'absence de phénomène de recrutement a été démontrée et l'absence d'information visuelle implique que les mouches présentes dans le compartiment de capture ou dans la boîte de piégeage ont été attirées uniquement par les stimuli olfactifs émis par le fruit. Ces deux dispositifs sont donc convenables pour quantifier l'attraction olfactive de *B. cucurbitae* pour des effluves de fruits.

Néanmoins, les essais en olfactométrie n'ont pas été concluants à cause d'un grand nombre de facteurs externes non contrôlés dans le laboratoire (intensité lumineuse, renouvellement et pureté de l'air). En revanche, le dispositif en petites cages installé en salle climatique avec des conditions de température (T) et



d'humidité relative (H.R.) contrôlées ( $T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ , H.R. =  $70 \pm 10\%$ ) s'est avéré efficace et répétable pour mesurer l'attractivité vis-à-vis de *B. cucurbitae*. Des études comportementales en petites et grandes cages (sans flux d'air) étudiant la réponse olfactive de *B. cucurbitae* à des appâts protéinés et /ou des plantes ont également été réalisées avec succès (Gratecap 2009, Miller et al. 2004). Cependant comme le rapporte Vayssières (1999), l'étude de la réponse comportementale « innée » (sans expérience) des femelles de *B. cucurbitae* à différents stimuli fait apparaître une certaine variabilité inter-individus dans la réponse d'orientation. C'est pourquoi il est nécessaire d'évaluer la sur-dispersion des données par un test de validation croisé, afin d'exclure les valeurs non expliquées par notre modèle théorique, basé sur la loi binomiale. Ce modèle constitue la base sur laquelle les conditions expérimentales (nombre de cages et de femelles par cages) ont été déterminées, a priori, afin de conserver une étendue d'intervalle de confiance correcte (10.57 %). D'autres paramètres intrinsèques à l'espèce de mouche, tels que la période préférentielle de ponte au cours de la journée, sont à considérer dans notre étude pour ne pas sous estimer l'attractivité d'une plante. En effet, nos tests ont démontré que l'optimum de réponse des femelles a lieu entre 8h00 et 14h00, période qui correspond aux heures préférentielles de ponte indiquées par Nishida & Bess (1957), et qui est proche de celles observées sur des parcelles de courgette (10h00-15h00) lors d'études sur les rythmes circadiens de cette espèce (Atiama-Nurbel 2008).

Enfin, nos essais ont démontré qu'en petites cages, une durée de 2 heures d'exposition aux effluves est suffisante pour mesurer l'attraction olfactive. Peu d'essais ayant été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales, la comparaison avec d'autres travaux est délicate. Si la durée choisie pour nos essais paraît importante, il faut rappeler que le dispositif de petites cages se caractérise par l'absence de flux d'air. La diffusion des effluves y est donc plus lente et l'orientation des mouches ne se fait pas contre un flux laminaire horizontal mais selon un nuage d'odeurs diffus. Dans plusieurs études comportementales sur Tephritidae, des temps importants d'exposition aux effluves sont également préconisés (jusqu'à 20 heures) (Alagarmalai et al. 2009, Siderhust & Jang 2010).

La difficulté d'obtenir des essais répétables en olfactomètre souligne l'importance de manipuler dans une zone dédiée à l'olfactométrie, soit une pièce isolée et aérée avec des conditions de température, de luminosité et d'humidité contrôlées et constantes ( $T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ , H.R. =  $70 \pm 10\%$ ). En effet, *B. cucurbitae* semble très sensibles aux facteurs environnementaux, particulièrement à l'intensité lumineuse qui doit être comprise entre 1500 et 3000 lux et, surtout, qui doit être répartie de manière homogène sur le dispositif pour ne pas entraîner de phénomène de phototaxie. En revanche, nos essais en petites cages ont permis d'obtenir des résultats d'attraction stables et reproductibles. Une limite possible de cette étude est qu'elle ne permet d'observer l'attraction olfactive qu'en fin de manipulation et ne permet donc pas d'observer la cinétique de réponse qui pourrait constituer un autre paramètre intéressant pour mesurer l'attractivité d'un fruit. De plus, ce dispositif permet de déterminer les stimuli olfactifs impliqués dans la phase de localisation à courte distance mais ne permet pas de hiérarchiser les séquences comportementales comme elles ont pu l'être chez



*N. cyanescens* en tunnel de vol (Brévault & Quilici 2007b). Enfin, du fait de la taille des cages, les essais ne peuvent être effectués qu'en situation de choix binaire. Des essais en grandes cages extérieures pourraient permettre de comparer un plus grand nombre de sources d'odeur en situation de choix et de plus, d'obtenir des résultats valables en conditions semi-naturelles.

## **II- Etude de l'influence de certains paramètres physiologiques des femelles sur leur réponse comportementale**

Les essais testant l'influence de l'âge des femelles sur l'attraction vers les fruits-hôtes ont notamment pour but de déterminer si leur réponse dépend de la maturité sexuelle et si elle varie au cours de la vie de la femelle. Dans nos essais, les premières réponses comportementales apparaissent lorsque les mouches sont âgées de 15 jours et ont donc atteint leur maturité sexuelle. De plus, avec l'âge les femelles de *B. cucurbitae* manifestent un intérêt croissant pour l'odeur du fruit hôte (dans le cas du concombre) et même après l'acquisition de la maturité sexuelle, le pourcentage de réponses à l'odeur du fruit continue à augmenter. En premier lieu, l'acquisition de la maturité sexuelle joue clairement un rôle important dans la réponse des femelles de *B. cucurbitae* aux stimuli olfactifs du fruit-hôte. En effet, les femelles de *B. cucurbitae* sont considérées comme sexuellement matures 10 à 12 jours après l'éclosion à 25°C (Vayssières, Carel & Coubes 2002), âge à partir duquel elles répondent dans nos essais. L'âge des femelles de *R. pomonella* affecte également de manière significative, la probabilité qu'elles découvrent un fruit et le temps mis pour le localiser (Duan & Prokopy 1994). Ainsi, l'acquisition de la maturité sexuelle des femelles conditionnerait leur réponse olfactive. Cette hypothèse est appuyée par des études sur le moustique *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) qui soulignent que la maturation des ovaires déclenche une chaîne neuro-hormonale qui rendrait les femelles réceptives aux stimuli associés au site de ponte (Klowden 1990). Une fois la maturité sexuelle acquise, on peut supposer que la motivation des femelles de *B. cucurbitae* à trouver un site d'oviposition, qui se traduit notamment par la réponse aux stimuli olfactifs, augmente avec la durée pendant laquelle les femelles sont privées de support de ponte. Ainsi, plus les femelles sont âgées, plus elles seraient motivées à pondre et à accepter plus facilement les fruits-hôtes.

Il conviendrait de vérifier cette hypothèse en poursuivant les essais avec des mouches plus âgées pour savoir si, à un certain stade, la réponse cesse d'augmenter. Browne (1993) souligne que chez les insectes, l'âge des femelles s'accompagne de changements physiologiques comme le développement des ovaires et la production d'œufs. Ainsi, l'âge est directement relié à la capacité de réponse aux stimuli et constitue un facteur important de variation du comportement dans le temps.

Un autre paramètre physiologique pouvant influencer la recherche du fruit-hôte, notamment chez les mouches des fruits (Papaj *et al* 1989), est la charge en œufs matures, liée à l'acquisition de la maturité sexuelle et donc à l'âge. La prise en compte de ce facteur physiologique est importante pour comprendre les variations observées dans le comportement de ponte. Nos essais ont permis de montrer qu'à l'acquisition de

la maturité sexuelle, la réponse olfactive augmente avec la charge en œufs. De plus, le nombre d'œufs augmente jusqu'à ce que l'âge des femelles atteigne 25 jours. La privation de support de ponte peut être l'une des causes de l'augmentation de la charge en œufs. Ensuite, au-delà de 25 jours, la charge en œufs moyenne cesse d'augmenter, ce qui pourrait correspondre aux limites physiques liées à la structure de l'appareil génital des femelles (nombre d'ovarioles), dont chacun des 2 ovaires peut contenir en moyenne 19 ovarioles selon (Sumatra 1995). Néanmoins cette charge en œufs ne reste pas stable, en effet le nombre moyen d'œufs par femelle est plus faible lorsque ces dernières sont âgées de 35 jours que lorsqu'elles sont âgées de 25 jours. Ceci est probablement dû à un « largage » des œufs en surnombre sur des supports non appropriés à la ponte (Aluja *et al.* 2001) tels que les parois des cages d'élevage ou les abreuvoirs. La maturité des ovaires et la présence d'œufs ont donc un rôle déterminant dans le déclenchement de la réponse olfactive des femelles. En revanche, on n'observe pas de différence de charge en œufs entre les individus ayant répondu et ceux n'ayant pas répondu, le profil de réponse à l'odeur semblant indépendant de la charge (quantité d'œufs matures). Par ailleurs, la majorité des femelles qui ont des œufs, ont une charge en œufs supérieure au nombre total d'ovarioles indiquée par Sumatra (1995) (un maximum de 96 œufs matures a même été compté chez une femelle). On peut penser que, privées de support de ponte, les femelles sont susceptibles, dans un premier temps, d'accumuler plusieurs œufs au sein de chaque ovariole (Aluja *et al.* 2001). Ainsi, chez les femelles matures, plus qu'à la charge en œufs, la réponse semble être liée à l'âge, et en particulier à la durée pendant laquelle la femelle gravide est privée de site de ponte. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait renouveler l'expérience en comparant la réponse de femelles de même âge privées ou non de support de ponte. Comme nous l'avons observé chez *B. cucurbitae*, les femelles de certaines espèces de mouches comme *Calliphora vomitoria* (L.) (Campan 1977) et *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera : Calliphoridae) deviennent sensibles aux odeurs de l'hôte seulement lorsque leurs premiers œufs arrivent à maturité (Hammack *et al.* 1987). Une augmentation de la charge en œufs est observée aussi chez *Anastrepha ludens* et *Anastrepha obliqua* (Aluja *et al.* 2001) qui se traduit également par l'accumulation d'un grand nombre d'ovocytes. Chez les drosophiles, cette accumulation diminue la discrimination des femelles qui acceptent alors comme support de ponte des plantes peu attractives, voire non-hôtes (Courtney *et al.* 1989). Ceci reflète donc plus la « motivation de ponte » que l'attractivité du fruit.

Des limitations à ces essais peuvent être évoquées. Tout d'abord, il n'a pas été possible de déterminer avant l'essai si les femelles avaient déposé une partie de leurs œufs dans les cages d'élevage. Il serait intéressant de réitérer ces essais avec des femelles isolées en micro-bonnette afin d'estimer la part de « largage » et son influence sur la réponse des mouches. Enfin, les femelles piégées dans les boîtes pendant les deux heures d'expérimentation ont été en contact avec des morceaux de fruit. Elles ont donc potentiellement pu pondre, ce qui a pu affecter le nombre d'œufs comptés après dissection. Néanmoins, nous avons tenu compte de cette éventualité et avons vérifié visuellement l'absence d'œufs dans les boîtes.



### III- Attractivité relative de différents fruits et/ou stades phénologiques

L'étude de l'attractivité olfactive du concombre de variété « Vantage » à différents stades phénologiques démontre clairement que le stade de développement du fruit influence l'attraction des femelles, le nombre de femelles attirées par l'odeur augmentant avec la maturité du fruit. Selon Schoonhoven *et al.* (1998), la concentration en composés volatils varie en fonction de l'organe de la plante hôte et également de son stade phénologique, ce qui influence les préférences trophiques. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Brévault & Quilici (2009b) qui mettent en évidence que, chez les femelles de *N. cyanescens*, les odeurs de tomates mûres induisent plus de réponses de la part des femelles que celle des tomates vertes. Chez *C. capitata*, l'odeur des drupes mûres de café est également plus attractive que celles de drupes vertes (Prokopy & Vargas 1996, Prokopy *et al.* 1997). Cependant, en conditions naturelles, Vayssières & Carel (1999) notent que les pontes sont effectuées dans les ovaires non fécondés et majoritairement dans les jeunes fruits dont l'épicarpe et la pulpe sont tendres, ce qui facilite la pénétration de l'ovipositeur. Chez *N. cyanescens*, où un comportement similaire est observé, les odeurs de fruits mûrs auraient, selon Brévault & Quilici (2009b), un rôle privilégié dans l'attraction à distance et seraient moins déterminantes dans la décision finale de ponte, plus influencée par des stimuli visuels et tactiles.

La comparaison de l'attractivité de différents fruits-hôtes a mis en évidence la variabilité de l'attraction des femelles selon le fruit. Le raisin, fruit non-hôte, n'a attiré aucune femelle dans les dispositifs. La pipangaille lisse et le concombre de variété « Showy Green » présentent les plus forts taux d'attraction. La pastèque, le melon, la margose sauvage, la margose cultivée et la margose de l'Inde présentent une attractivité intermédiaire alors que la pipangaille à côte, le patole, la citrouille et la courgette sont peu attractifs. L'attractivité de la margose cultivée, de la margose de l'Inde et de la margose sauvage est similaire (32.6 %, 26.30 % et 32.4 % respectivement). Il serait intéressant de faire des études approfondies sur la composition des composés volatils de ces 3 variétés pour déterminer les composés communs dans leurs bouquets d'effluves et ceux qui sont susceptibles d'intervenir dans l'attraction olfactive vers cette espèce. L'attractivité différentielle observée au sein de cette gamme d'hôtes est probablement liée à la quantité ou à la qualité des composés volatils émis par les différents fruits-hôtes.

Peu de travaux ont été réalisés sur l'attraction olfactive de *B. cucurbitae* pour sa gamme d'hôtes ; de manière générale, les études portent le plus souvent sur l'attraction olfactive d'une seule espèce de fruit-hôte. Le concombre a souvent été utilisé (Siderhust & Chang 2010), car il est connu pour être particulièrement attractif (Miller *et al.* 2004, Pinero *et al.* 2006), ce que confirment nos résultats. Miller *et al.* (2004) ont mesuré l'attractivité olfactive de certains fruits hôtes et celle d'odeurs de protéines en cages de comportement, en comptant le nombre de mouches qui se posent sur la source d'odeur. Nos résultats sont en accord avec ceux de ces derniers auteurs : le concombre s'est avéré plus attractif que le melon et la citrouille plus attractive que la courgette. Par contre, Miller *et al.* (2004) observent que la citrouille et la courgette



s'avèrent plus attractives que la margose ce qui ne concorde pas avec nos résultats. De telles différences phénotypiques sont peut-être dues à des différences génétiques des mouches ou à l'utilisation de fruits de variétés différentes selon les études.

La réponse différentielle de *B. cucurbitae* à différentes espèces au sein de sa gamme d'hôtes a rarement été étudiée par des méthodes d'olfactométrie. En revanche, on dispose de nombreuses données sur l'évaluation au champ des taux d'infestation des fruits (Jahkar 2005, Mwatawala *et al.* 2010). Les résultats de nos essais en olfactométrie coïncident parfois avec ceux de ce type d'études, mais on note une certaine variabilité selon la plante hôte considérée et selon la zone géographique de l'étude. La comparaison entre les résultats d'études sur les stimuli olfactifs et d'études de terrain reste donc très délicate. Dans notre étude, la mesure de l'attractivité de la courgette et de la citrouille a permis de tester l'existence d'un éventuel conditionnement larvaire. Selon Brévault (2009b), l'expérience acquise au contact de la première espèce végétale rencontrée peut affecter les choix ultérieurs et la stratégie de recherche de l'hôte de l'insecte. Prokopy *et al.* (1988) ont observé que les femelles de *R. pomonella* dont l'hôte larvaire d'origine est une pomme, acceptent plus facilement les pommes que des femelles dont l'hôte larvaire est une baie d'aubépine. Les adultes utilisés dans notre étude proviennent de larves ayant été élevées sur courgette et nourries avec de la citrouille. Néanmoins, ces deux fruits présentent les taux de réponse olfactive les plus faibles, ce qui laisse penser qu'un éventuel conditionnement larvaire n'influence pas la réponse des femelles. Ces résultats pourraient être confirmés en répétant les essais avec des mouches élevées sur un autre substrat ou sur un milieu artificiel.

La principale limite de nos essais est que l'influence des stades phénologiques du fruit n'a été évaluée que sur une seule variété de concombre et que les caractéristiques des stades phénologiques varient d'une espèce végétale à l'autre et d'une variété à l'autre. Il serait intéressant de vérifier l'hypothèse selon laquelle la réponse olfactive augmente avec la maturité des fruits en testant différents fruits hôtes. De plus il serait intéressant de vérifier si la hiérarchisation des niveaux de réponse, observés lors de la comparaison de l'attractivité des 11 fruits hôtes, suit le même profil avec des fruits de stades de développement différents.

#### **IV Perspectives de recherche**

Notre étude a permis de mettre au point un procédé expérimental fiable et reproductible pour évaluer l'attractivité de différents fruits hôtes pour les femelles de *B. cucurbitae*. Cette méthode pourrait être appliquée à d'autres Tephritidae voire à d'autres insectes pour mesurer l'attractivité de plantes hôtes, d'appâts alimentaires ou de phéromones sexuelles. Néanmoins, ce dispositif ne faisant pas intervenir de flux d'air, il ne permet d'évaluer que l'attraction à très courte distance alors qu'en conditions naturelles, les effluves sont transportés par le vent sous forme de panache d'odeur. Ainsi, pour se rapprocher des conditions naturelles auxquelles les femelles de *B. cucurbitae* sont confrontées et pour évaluer l'attraction

olfactive à moyenne distance, il serait intéressant d'améliorer les conditions expérimentales du laboratoire pour réaliser des études d'olfactométrie.

Enfin, les résultats de notre étude ont permis de hiérarchiser les niveaux d'attraction de 11 fruits hôtes de *B. cucurbitae*. Ainsi, nos travaux apportent des connaissances supplémentaires permettant d'orienter de futures études d'écologie chimiques visant à déterminer les composants impliqués dans la localisation de l'hôte. Il serait intéressant de définir s'il s'agit d'un mélange de plusieurs composés propres à la famille des Cucurbitaceae dont le ratio en quantité et en qualité est déterminant, ou s'il s'agit de molécules attractives encore plus spécifiques de certaines espèces ou variétés.

## Conclusion

La présente étude a permis de mettre au point une nouvelle méthode fiable et reproductible pour quantifier l'attractivité de diverses plantes-hôtes pour les femelles de *B. cucurbitae*.

Ce dispositif de petites cages de comportement a permis de discriminer l'attractivité de 11 fruits-hôtes de l'espèce. Trois niveaux d'attractivité ont été observés (fruits très attractifs, attractifs et peu attractifs), le concombre et la pipangaille lisse apparaissant comme les fruits les plus attractifs. Cette étude a également démontré que le stade de développement du fruit influence fortement les préférences trophiques et l'attraction des femelles. Ce travail a également apporté de nouvelles connaissances sur les paramètres physiologiques pouvant influencer l'attraction des femelles pour leurs fruits-hôtes. La maturité sexuelle des femelles est nécessaire au déclenchement de la réponse olfactive, qui augmente avec l'âge des mouches. En revanche aucune relation entre la charge en œufs de celles-ci et le niveau de réponse n'a été mise en évidence.

Cette étude ouvre des perspectives de recherches et d'applications multiples. Il serait notamment intéressant d'appliquer cette méthode à d'autres modèles biologiques et il serait également pertinent de continuer les investigations sur l'identification et l'isolement des kairomones présentes dans les fruits-hôtes, aux stades phénologiques les plus attractifs, ce qui permettrait d'améliorer le pouvoir attractif des pièges visant les femelles de *B. cucurbitae*, pour la surveillance ou la gestion des populations de ce ravageur.

## Références bibliographiques

- Agelopoulos N., M.A. Birket, A.J. Hick, A.M. Hooper, J.A. Pickett, E.M. Pow, L.E. Smart, D.W.M. Smiley, L.J. Wadhams and C.M. Woodcock. 1999. Exploiting semiochemicals in insect control. *Pesticide Science* 55: 225-235.
- Alagarmalai J., D. Nestel, D. Dragushich, E. Nemny-Lavy, L. Anshelevich, A. Zada and V. Soroker. 2009. Identification of host attractants for the Ethiopian Fruit Fly, *Dacus ciliatus* Loew. *Journal of Chemical Ecology* 35:542-551.
- Aluja M., I. Jacome, A. Birke, N. Lozada and G. Quintero. 1993. Basic patterns of behaviour in wild *Anastrepha striata* flies under field-cage conditions. *Annals of the Entomological Society of America* 86:776-793.
- Aluja M. and R.J. Prokopy. 1993. Host odor and visual stimulus interaction during intra-tree host finding behavior of *Rhagoletis pomonella* flies. *Journal of Chemical Ecology* 18:2671-2696.
- Aluja M., F. Diaz-Fleischer, D.R. Papaj, G. Lagunes and J. Sivinski J. 2001. Effects of age, diet, female density and the host resource on egg load in *Anastrepha ludens* and *Anastrepha oblique* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology* 47: 975-988.
- Atiama-Nurbel T. 2008. Interactions entre les mouches des Cucurbitaceae et les plantes de bordure dans les systèmes horticoles à La Réunion. Rapport de stage. Université de la Réunion, 20.
- Bateman M.A. 1972. The Ecology of Fruit Flies. *Annual Review of Entomology* 17:493-518.
- Benjamini Y. and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57: 289–300.
- Bernays E.A. and R.F. Chapman. 1994. Host-Plant Selection By Phytophagous insects. Ed Chapman & Hall, New York.312.
- Bosser J., T.H. Cadet, J. Guého et W. Marais. 1990. Flore des Mascareignes : La Réunion, Maurice, Rodrigues. The Sugar Industry Research Institute, Mauritius; L'institut Français de recherche scientifique pour le développement en coopération (ORSTOM), Paris ; The royal botanic garden, Kew 101:1-22.
- Brévault T. and S. Quilici. 1999. Factors affecting behavioral responses to visual stimuli in the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens*. *Physiological Entomology* 24:333-338.



- Brévault T. and S. Quilici. 2000a. Relationships between temperature, development and survival of different life stages of the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyaneescens*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 94:25-30.
- Brévault T. and S. Quilici 2000b. Dial patterns of reproductive activities in the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyaneescens*. *Physiological Entomology* 25:1-9.
- Brévault T. and S. Quilici 2007a. Visual response of the tomato fruit flies, *Neoceratitis cyaneescens*, to colored fruit models. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 125:44-55.
- Brévault T. and S. Quilici 2007b. Influence of habitat pattern on orientation during host fruit location in the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyaneescens*. *Bulletin of Entomological Research*. 97:637-642.
- Brévault T. and S. Quilici 2009a. Flower and fruit volatiles assist host-plant location in the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyaneescens*. *Physiological Entomology* 35:9-18.
- Brévault T. and S. Quilici. 2009b. Oviposition preference in the oligophagous tomato fruit fly, *Neoceratitis cyaneescens*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 133:165-173.
- Brévault T. and S. Quilici 2010. Interaction between visual and olfactory cues during host finding in the tomato fruit fly *Neoceratitis cyaneescens*. *Journal of Chemical Ecology* 36:249-59.
- Browne L.B. 1993. Physiologically induced changes in resource oriented behavior. *Annual Review of Entomology* 38:1-23.
- Bruce T.J.A., L.J. Wadhams and C.M. Woodcock 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science* 10:269-274.
- Cabrera M. and K. Jaffe. 2007. An aggregation pheromone modulates lekking behavior in the vector mosquito *aedes aegypti* (diptera: culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 23(1):1-10.
- Campan M. 1977. Etude du comportement d'orientation des femelles de *Calliphora vomitoria* (Diptères) vers l'odeur du lieu de ponte. Mise en évidence du rôle de l'ovaire. *General and Comparative Endocrinology* 31 (4) : 442-450.
- Carde R.T. and M.A. Willis. 2008. Navigational strategies used by insects to find distant, wind-borne sources of odor. *Journal of Chemical Ecology* 34:854-866.

- Cha D., S. Nojima, S. Hesler, A. Zhang, C. Linn, W. Roelofs and G. Loeb. 2008. Identification and field evaluation of grape shoot volatiles attractive to female Grape Berry Moth (*Paralobesia viteana*). *Journal of Chemical Ecology* 34:1180-1189.
- Clarke A.R., K.S. Powell, C.W. Weldon and P.W Taylor. 2011. The ecology of *Batrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae): What do we know to assess pest management? *Annals of Applied Biology* 158:26-54.
- Clopper C. and E.S. Pearson. 1934. "The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial". *Biometrika* 26: 404-413.
- Courtney S.P., G.K. Chen and A. Gardner. 1989. A general model for individual host selection. *OIKOS* 55:55-65.
- Cruz-Lopez L., E.A. Malo, J. Toledo, A. Virgen, A. del Mazo and J.C. Rojas. 2006. A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. *Journal of Chemical Ecology* 32:351-365.
- D'Alessandro M. and T.C.J. Turlings. 2005. *In Situ* Modification of Herbivore-Induced Plant Odors: A novel Approach to Study the attractiveness of volatile Organic Compounds to Parasitic Wasps. *Chemical Senses* 30:739-753.
- Dhillon M.K., R. Singh, J.S. Naresh and H.C. Sharma. 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: a review of its biology and management. *Journal of Insect Science* 5:40.
- Dilrukshika S.V.C.V and M.M.S.C. Karunaratne. 2009. Behavioural responses of the female melon fly *Bactrocera cucurbitae* to male produced sex pheromone. *Vidyodaya Journal of Science* 14: 65-78.
- Duan J.J. and R.J. Prokopy. 1994. Apple maggot fly response to red sphere traps in relation to fly age and experience. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 73: 279-287.
- Etienne J. 1972. Les principales Tephritides de l'île de La Réunion. *Annales de la Société Entomologique de France* 8:485-491.
- Fletcher B.S. 1987. The biology of Dacine fruit flies. *Annual Review of Entomology* 32:115-144.
- Gonzalez R, J. Toledo, L. Cruz-Lopez, A. Virgen, A. Santiesteban and E.A. Malo. 2006. A new blend of white sapote fruit volatiles as potential attractant to *Anastrepha ludens* (Diptera : Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 99(6):1994-2001.
- Gratecap M. 2009. Gestion agro-écologique des Mouches des légumes à la Réunion. Efficacité d'un appât adulticide, le Syneïs appât®. Rapport de stage. AgroParisTech, 29.

- Hammack L., M. Bromel, F.M. Duh, G. Gassner. 1987. Reproductive Factors Affecting Responses of the Screwworm Fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), to an Attractant of Bacterial Origin. *Annals of the Entomological Society of America* 80 (6):775-780.
- Husson R. 1968. Taxie, tactisme et tropisme. *Bulletin of the world Health Organization* 38:799-802.
- Jakhar B.L and B.L Pareek. 2005. Preference of Melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquilett) to various cucurbits under semi arid region of Rajasthan. *Indian Journal of Entomology* 67 (3): 287-288.
- Katsoyannos B.I., E.F. Boller and U. Remund. 1980. A simple olfactometer for the investigation of sex pheromones and other olfactory attractants in fruit flies and moths. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 90:105-112.
- Klowden M.J. 1990. The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia* 46:660-670.
- Mackenzie A. and A.F.G Dixon. 1990. Host alternation in Aphids: Constraint versus optimization. *American Naturalist* 136:132-134.
- Malo E.A., L. Cruz-Lopez, J. Toledo, A. Del Mazo, A. Virgen and J.C. Rojas. 2005. Behavioral and electrophysiological responses of the Mexican fruit fly (Diptera : Tephritidae) to guava volatiles. *Florida Entomologist* 88:364-371.
- Mille C. 1994. Etude olfactométrique de quelques stimuli pour la mouche du Natal, *Ceratitis (Pterandrus) rosa* Karsch. Rapport de stage. Institut technique d'Outre-Mer, 30.
- Miller N.W., R. Vargas, R.J. Prokopy and B.E. Mackey. 2004. State-dependant attractiveness of Protein bait and host fruit odor to *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) females. *Entomological Society of America* 1063-1068.
- Minkenberg O.P.J.M., M. Tatar and J.A. Rosenheim. 1992. Egg load as a major source of variability in insect foraging and oviposition behavior. *Oikos* 65:134-142.
- Moran N.A. 1992. The evolution of Aphid life cycles. *Annual Review of Entomology* 37:321-348.
- Murlis J., J.S. Elkinton and R.T. Carde. 1992. Odor plumes and how insects use them. *Annual Review of Entomology* 37:505-532.
- Mwatawala M., A.P. Maerere, R. Makundi and M. De Meyer. 2010. Incidence and host range of the melon fruit fly *Bactrocera cucurbitae* (Coquilett) (Diptera: Tephritidae) in Central Tanzania. *International journal of Pest Management* 56 (3):265-273.



- Nicolis S.C. 2003. Dynamique du recrutement alimentaire et de l'agrégation chez les insectes sociaux. Travaux de thèse. Université de Bruxelles, 11.
- Nishida T. and H.A. Bess. 1950. Applied ecology in melon fly control. *Journal of Economic Entomology* 43:877-883.
- Nishida T. and H.A. Bess. 1957. Studies on the ecology and control of the melon fly *Dacus (Strumeta) cucurbitae* Coquilett (Diptera: Tephritidae). Technical Bulletin of the Hawaii Agricultural Experiment Station 34:1-44.
- Nojima S., C. Linn and W. Roelofs. 2003. Identification of host fruit volatiles from flowering dogwood (*Cornus florida*) attractive to dogwood-origin *Rhagoletis pomonella* flies. *Journal of Chemical Ecology* 29:2347-2357.
- Papaj D.R., B.I. Katsoyannos and J. Hendrichs. 1989. Use of fruit wounds in oviposition by Mediterranean fruit flies. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 53 (3): 203-209.
- Pinero JC, Jacome I, Vargas R and Prokopy R.J. 2006. Response of female melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 121: 261-269.
- Prokopy R.J., A.L. Averill, S.S. Cooley and C.A. Roitberg. 1982. Associative learning of apple fruit biotypes by apple maggot flies. *Science* 218:76-77.
- Prokopy R.J., R.D. Scott and S.S. Cooley. 1988. Behavioral evidence for host races in *Rhagoletis pomonella* flies. *Oecologia* 76 (1): 138-147.
- Prokopy R.J. and R. I. Vargas. 1996. Attraction of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) flies to odor of coffee fruit. *Journal of Chemical Ecology* 22 (4): 807-820.
- Prokopy R.J., T.W. Phillips, R.I. Vargas and E.B. Jang. 1997. Defining Sources of Coffee Plant Odor Attractive to *Ceratitidis Capitata* Flies. *Journal of Chemical Ecology* 23(6) : 1577-1587.
- Ryckewaert P., J.P. Deguine, T. Brevault and J.F. Vayssières. 2010. Fruit flies (Diptera: Tephritidae) on vegetable crops in Reunion island (Indian Ocean): state of knowledge, control method and prospects for management. *Fruits* 65:113-130.
- Robacker D.C. and I. Fraser. 2001. Effect of Food Deprivation on Attraction of Mexican Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) to Grapefruit in a Wind tunnel. *Annals of the Entomological Society of America* 94:954-958.

- Robert P.C. 1986. Les relations plantes-insectes phytophages chez les femelles pondeuses : le rôle des stimuli chimiques et physiques. Une mise au point bibliographique. *Agronomie* 6:127-142.
- Schoonhoven L.M., T. Jermy and J. J. A. van Loon. 1998. Insect-plant biology, from physiology to evolution. Ed. Chapman & Hall, London. 421.
- Siderhurst M.S. and E.B. Jang. 2006. Female-biased attraction of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), to a blend of host fruit volatiles from *Terminalia catappa* L. *Journal of Chemical Ecology* 32:2513-2524.
- Siderhurst M.S. and Jang E.B. 2010. Cucumber Volatile Blend Attractive to Female Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *Journal of Chemical Ecology* 36: 699-708.
- Sullivan B.T., E.M. Pettersson, K.C. Selmann, and C.W. Berisford. 2000. Attraction of the bark beetle parasitoid *Roptrocerus xylophagorum* (Hymenoptera: Pteromalidae) to host associated olfactory cues. *Environmental Entomology* 29:1138–1151.
- Sumatra E. 1995. Anatomie descriptive des appareils génitaux femelle des différentes espèces de « Mouches des fruits » présente à La Réunion. Rapport de stage. Université de La Réunion, 11.
- Sword G.A. and R.F. Chapman. 1994. Monophagy in polyphagous grasshopper, *Schistocerca gossypii*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*. 73:255-264.
- Syed R.A. 1969. Studies of the ecology of some important species fruit flies and their natural enemies in Pakistan: Pakistan Commonwealth Institute-Biological Control Station, 12.
- Turlings T.C.J., A.C. Davison and C. Tamo. 2004. A six-arm olfactometer permitting simultaneous observation of insect attraction and odor trapping. *Physiological Entomology* 29:45-55.
- Vargas R. I., W.A. Walsh, D. Kanehisa, J.D. Stark and T. Nishida. 2000. Comparative Demography of Three Hawaiian Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) at Alternating Temperatures. *Entomological Society of America* 93:75-81.
- Vayssières J.F. 1999. Les relations insectes-plantes chez les Dacini (Diptera : Tephritidae) ravageurs des Cucurbitaceae à La Réunion : Muséum d'histoire Naturelle à Paris. 205.
- Vayssières J.F. and Y .Carel. 1999. Les Dacini (Diptera: Tephritidae) inféodés aux Cucurbitaceae à la Réunion: Gamme de plantes et stades phénologiques préférentiels des fruits au moment de la pique pour des espèces cultivées. *Annales de la Société Entomologique de France* 35:197-202.

- Vayssières J. F., Y. Carel and M. Coubes. 2002. Demographic parameters and biotic factors of two Dacini species, *Bactrocera cucurbitae* and *Dacus ciliatus*, on Reunion Island. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Fruit Fly Symposium 91-95.
- Vayssières J. F., Y. Carel, M. Coubes and P.F. Duyck. 2008. Development of immature stages and comparative demography of two cucurbit-attacking fruit flies in Reunion Island: *Bactrocera cucurbitae* and *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae). Environmental Entomology 37:307-14.
- Zhang A.J., C. Linn, S. Wright, R. Prokopy, W. Reissig and W. Roelofs. 1999. Identification of a new blend of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. Journal of Chemical Ecology 25:1221-1232.
- Zhu J., K.C. Park and T.C. Baker. 2003. Identification of odors from overripe mango that attract vinegar flies, *Drosophila melanogaster*. Journal of Chemical Ecology 29:899-909.



# Glossaire

**Biofilm** : communauté multicellulaire et symbiotique de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.

**Conspécifique** : individus ou populations de la même espèce.

**Exocarpe** : couche externe de la paroi d'un fruit.

**Lek** : zone de réunion des mâles de certaines espèces animales, dans une compétition de séduction afin de déterminer les prérogatives pour l'accouplement.

**Holométabole** : insectes présentant des métamorphoses complètes et un stade nymphal bien différencié. Les formes larvaires sont distinctes morphologiquement et physiologiquement de l'état imaginal.

**Gravide** : se dit d'une femelle qui porte des œufs ou un (des) fœtus.

**Nymphose** : Transformation d'une larve en nymphe.

**Ovipositeur** : organe de ponte tubulaire des insectes femelles, situé à l'extrémité de l'abdomen et ordinairement rétracté dans l'abdomen.

**Oviposition** : action de ponte d'une femelle munie d'un ovipositeur.

**Phéromone** : substance volatile émise par un insecte à l'extérieur et qui, par ses propriétés chimiques agit comme messager et constitue un signal pour un partenaire sexuel ou un congénère de sa propre espèce.

**Pupe** : état intermédiaire du développement de certains insectes : c'est l'état qui sépare la larve de l'adulte. Seuls les insectes à métamorphose complète passent par cet état.

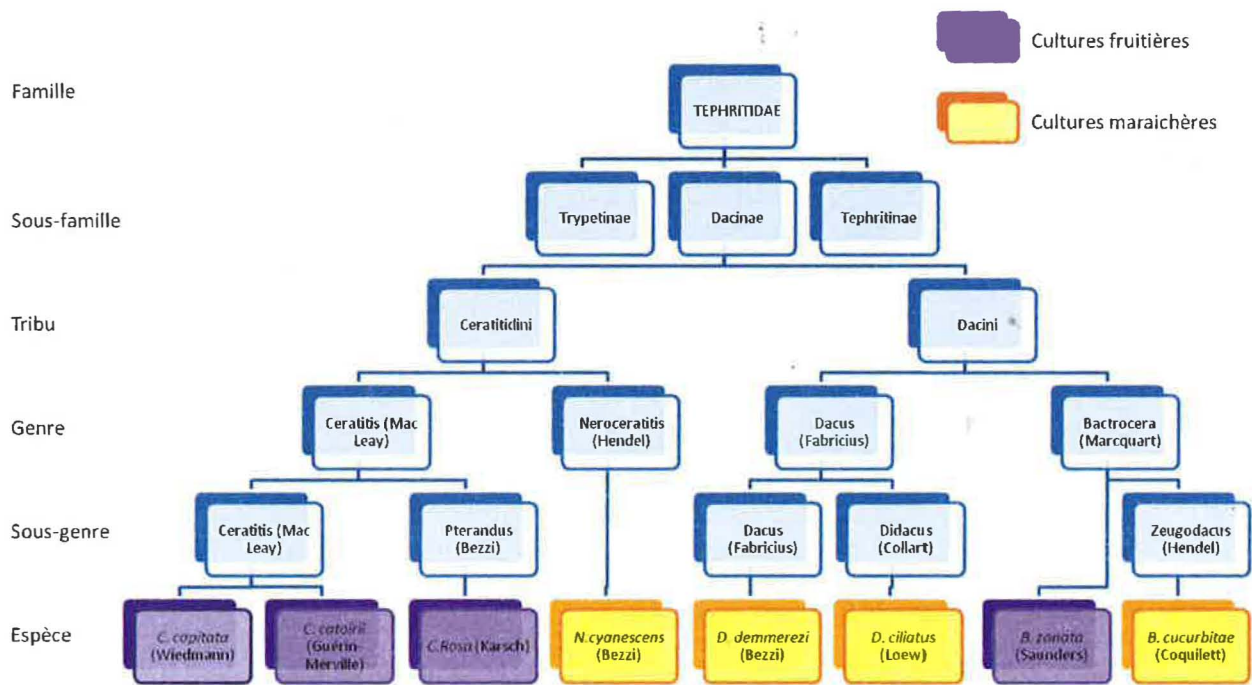
**Pupaison** : Transformation des larves des diptères en nymphes (pupes).

**Rythme circadien** : Période cyclique de changements biologiques basée sur une période d'environ 24 heures. Ils sont produits par des horloges biologiques, qualifiées elles aussi de circadiennes, qui agissent même en absence de tout stimulus extérieur.

**Tarses** : appendice situé à l'extrémité du tibia, articulé et mobile.

# Annexes

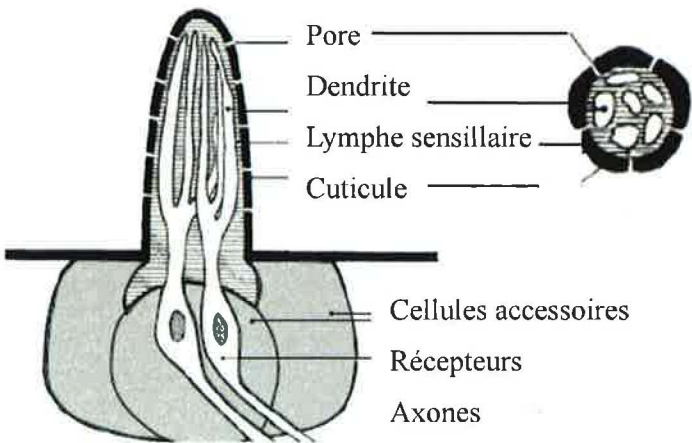
**Annexe 1:** Position taxonomique des espèces nuisibles aux cultures de la famille des Tephritidae de La Réunion (Schéma T. Atiama inspiré de Norrbom (2004)).



**Annexe 2:** Liste des plantes hôtes de *B. cucurbitae* à La Réunion (Vayssières 1999, Bosser et al. 1990).

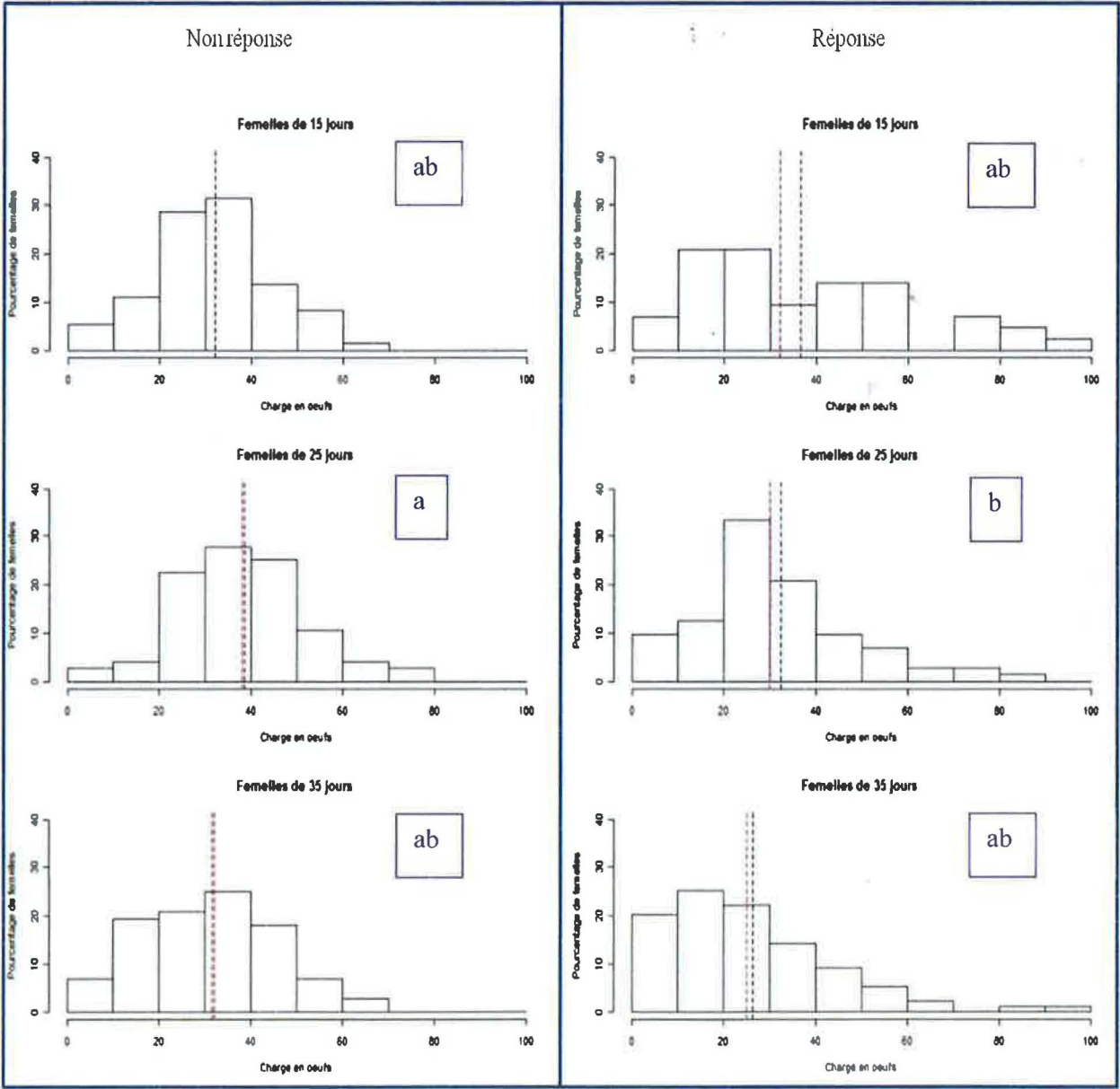
Espèces	Noms vernaculaires	cultivée/sauvage
<i>Citrullus colocynthis</i>	coloquinte	cultivée
<i>Citrullus lanatus</i>	pastèque	cultivée
<i>Cucumis melo</i>	melon	cultivée
<i>Cucumis sativus</i>	concombre	cultivée
<i>Cucurbita maxima</i>	potiron (citrouille)	cultivée
<i>Cucurbita moschata</i>	citrouille péi	cultivée
<i>Cucurbita pepo</i>	courgette	cultivée
<i>Cyclanthera pedata</i>	margoze lisse / de l'Inde	cultivée
<i>Lagenaria siceraria</i>	calebasse	cultivée
<i>Luffa acutangula</i>	pipangaille à côte	cultivée
<i>Luffa cylindrica</i>	pipangaille lisse	cultivée
<i>Momordica charantia</i>	margoze cultivée	cultivée
<i>Sechium edule</i>	chouchou	cultivée
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	patole	cultivée
<i>Coccinia grandis</i>	calebasse lierre	sauvage
<i>Momordica charantia</i>	margoze sauvage	sauvage
<i>Cucumis anguria</i>	concombre sauvage	sauvage
<i>Lagenaria sphaerica</i>	calebasse sauvage	sauvage

**Annexe 3 :** Schéma d’une sensille d’insecte (Extrait de Schoonhoven, Jermy & van Loon 1998). La sensille olfactive est innervée par deux chémorécepteurs bipolaires.





**Annexe 4 : Pourcentage moyen de femelles observées pour chaque classe de charge en œufs, en fonction de l'âge et de la réponse.** L'essai est répété 3 fois en petites cages sur un total de 12 cages (3 cages par âge) contenant chacune 30 femelles et 30 g de fruit. La ligne en pointillés rouge représente la médiane et la ligne en pointillés noirs représente la moyenne de la charge en œufs.



**Annexe 5 :** Attractivité olfactive de différents fruits hôtes en petites cages, représentée par le pourcentage moyen de réponse et l'écart type associé.

Les essais sont répétés une fois pour chaque fruit sur un total de 12 cages contenant chacune 30 femelles et 30 g de fruit. Le nombre de cages à éliminer des résultats pour chaque fruit est déterminé par validation croisée. Les lettres représentent les groupes des différentes modalités selon le modèle GLM appliqué, ainsi les moyennes ayant au moins une lettre en commun ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

Espèce	Nom vernaculaire	Cultivée (C)/ Sauvage (S)	Hôte (H)/ Non hôte (NH)	Nombre de cages éliminées par validation croisée	Pourcentage moyen de réponse ± écart type
<i>Luffa cylindrica</i>	Pipangaille lisse	C	H	1/12	58.48 ± 8.21 <sup>a</sup>
<i>Cucumis sativus</i>	Concombre	C	H	1/12	50.61 ± 8.00 <sup>a</sup>
<i>Citrullus lanatus</i>	Pastèque	C	H	4/12	35.42 ± 7.55 <sup>b</sup>
<i>Momordica charantia</i>	Margose	C	H	3/12	32.59 ± 9.97 <sup>bc</sup>
<i>Momordica charantia</i>	Margose	S	H	1/12	32.40 ± 10.95 <sup>bc</sup>
<i>Cyclanthera pedata</i>	Margose de l'Inde	C	H	4/12	26.30 ± 8.41 <sup>bc</sup>
<i>Cucumis melo</i>	Melon	C	H	2/12	25.30 ± 7.88 <sup>cd</sup>
<i>Luffa acutangula</i>	Pipangaille à côte	C	H	6/12	13.34 ± 5.16 <sup>de</sup>
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	Patole	C	H	4/12	12.92 ± 7.86 <sup>de</sup>
<i>Cucurbita moschata</i>	Citrouille pèi	C	H	1/12	11.82 ± 5.02 <sup>e</sup>
<i>Cucurbita pepo</i>	Courgette	C	H	2/12	4.67 ± 8.21 <sup>f</sup>
<i>Vitis vinifera</i>	Raisin	C	NH	2/12	0.00